

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Expression différentielle de douze gènes potentiellement impliqués dans la réponse de fibroblastes humains à des stress cytotoxiques ou subcytotoxiques

Chiarizia, Sophie

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Expression différentielle de douze gènes potentiellement impliqués dans la  
réponse de fibroblastes humains à des stress cytotoxiques ou  
subcytotoxiques**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Sophie Chiarizia

Juin 2002

## **Expression différentielle de douze gènes potentiellement impliqués dans la réponse de fibroblastes humains à des stress cytotoxiques ou subcytotoxiques**

CHIARIZIA Sophie

### Résumé

L'exposition de fibroblastes humains à divers types de stress, dont l'éthanol et le *tert*-butylhydroperoxyde, à des doses subcytotoxiques entraîne l'apparition d'une sénescence cellulaire prématurée (SIPS). Une étude transcriptomique par "differential display" et une étude protéomique par gels en deux dimensions (gel 2D) ont été réalisées au laboratoire pour comparer la sénescence répllicative (SR) et la SIPS.

Notre travail a débuté par la vérification, par RT-PCR en temps réel, de la variation de niveau de transcrits suggérée par l'étude de "differential display". Ceci nous a permis de mettre en évidence une différence de niveau de transcrits pour huit gènes, malgré une corrélation assez pauvre avec les résultats suggérés par le "differential display".

Ensuite, nous avons voulu savoir s'il existe une relation entre des variations de niveaux protéiques obtenues sur gel 2D et le niveau de transcrits correspondants en SR et en SIPS. Nous montrons que, pour quatre de ces protéines, une augmentation de niveau de transcrits va de pair avec une augmentation de niveau protéique. Enfin, pour trois candidats, susceptibles de jouer un rôle important dans la réponse cellulaire aux stress, nous avons construit, à partir de leur ADNc, des vecteurs d'expression permettant leur surexpression dans des fibroblastes humains avant de les exposer à divers types de stress. Cette stratégie expérimentale va pouvoir être appliquée à d'autres gènes, et des transfections rétrovirales vont pouvoir être effectuées pour tester comment ces gènes agissent sur l'apparition de la SIPS, lors de l'exposition de fibroblastes humains à des stress subcytotoxiques répétés.



Voici venu le moment de remercier toutes les personnes qui m'ont soutenues pendant ces quatre années et qui m'ont aidé à réaliser ce mémoire.

Je voudrais d'abord vous remercier Madame le Professeur Martine Raes pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et vous, Monsieur le Professeur José Remacle, pour vos nombreuses paroles réconfortantes.

Olivier, je voudrais te dire un grand merci pour toujours avoir été là à mes côtés dans les bons comme dans les « mauvais » moments, j'ai particulièrement apprécié ta franchise, ton sens de l'humour ainsi que ta façon de toujours prendre les choses du bon côté. Il me faudrait beaucoup plus que ces quelques lignes pour te dire à quel point j'ai été ravie de passer ces quelques mois dans ton équipe mais je vais malheureusement devoir m'arrêter là sinon je remplirai presque autant de pages qu'il n'y a dans la première partie de ce mémoire.

Merci à toi aussi Tcherry, pour ta patience, pas EASY de travailler avec Melle « Faute à pas de chance », et pourtant tu n'as jamais baissé les bras devant les ennuis (ma foi, si peu nombreux, on va le dire !!!).

Je voudrais également remercier toutes les personnes faisant partie de l'équipe des GRAS :

Toi, Michel, pour tes nombreux conseils et explications ;

Vous, Florence (mieux connue sous le nom de Miss Bouge !), Steph et François pour vos précieux coups de mains ;

Toi aussi, très cher Président de notre Fanklup, je voudrais te dire merci pour les nombreux E-mail que tu nous a envoyés pour nous réconforter dans les moments critiques ! Merci d'avoir délaissé ton



lit pour rester avec nous et nous aider dans cette mission dangereuse qu'est la mise en page de ce travail, je peux te dire que ton aide informatique en a dépanné plus d'un !

Eh bien non, Friedel, je ne t'ai pas oublié ! Merci beaucoup pour ces nombreuses révélations en chambre noire (rire !) et surtout de m'avoir consacré un peu (beaucoup) de ton temps au début de ce mémoire pour m'enseigner toutes tes connaissances.

Merci à toi aussi chère coéquipière de choc (et Dieu sait qu'il y en a eu !), je dois t'avouer que je ne sais pas ce que je serais devenue sans toi. Rassure toi, il ne s'agit pas d'une déclaration !!! Tes nombreux conseils et ton soutien moral m'ont été droit au coeur. J'espère que même lorsque le mémoire sera terminé, nous continuerons nos petites soirées détentes.

Céline, merci de la bonne humeur que tu apportes chaque matin en arrivant au laboratoire et d'avoir toujours été là au bon moment.

Un tout grand merci à toi Anne-France pour ton aide si précieuse, les nombreuses paroles d'encouragement ainsi que les petits cadeaux que tu nous as offerts. Travailler avec toi a été un réel plaisir.

Je voudrais aussi remercier les autres participants de la Cage Story (Val, Christelle, Marie, Sébastien, Cindy, etc. ) pour m'avoir fait passer de nombreuses soirées délirantes dont je garderai un excellent souvenir, ainsi que les URBMéens, et plus particulièrement, toi chère petite soeur qui a toujours été là et qui supportes toutes mes bêtises depuis bientôt 2 ans ! (Quel courage !), Valérie (« Feu !!!! »), Géraldine, Caroline, etc.

Je ne quitterai pas le cinquième étage sans remercier les Fratello's, j'ai passé de très bons moments en votre compagnie, merci d'avoir pimementé ma toute p'tite p'tite p'tite vie de mémorante qui aurait été moins marrante si vous n'aviez pas été là ! Je n'ai qu'un mot à vous

dire : Heu!!!!!! et ne changez surtout pas, quoi qu'on en dise, vous êtes plutôt relevés!!!!

Pour finir, je voudrais remercier ma famille et mes parents qui ont toujours été derrière moi et sans qui, je n'aurais pu faire ces études. Merci pour votre soutien et votre patience.

Je voudrais particulièrement remercier mon grand-père qui a toujours suivi mes études de très près et qui malheureusement ne pourra pas lire ce mémoire. Merci pour toutes les explications et les nombreuses fois où tu as éclairé ma lanterne. Je te dédicace ce mémoire,

Sophie



## TABLE DES MATIERES

<b>I INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
<b><i>I.1 Sénescence répllicative et vieillissement cellulaire .....</i></b>	<b>4</b>
<i>I.1.1 Historique .....</i>	4
<i>I.1.2 Sénescence répllicative in vivo.....</i>	4
<b><i>I.2 Relations entre stress et vieillissement.....</i></b>	<b>5</b>
<i>I.2.1 Introduction.....</i>	5
<i>I.2.2 Effet des stress sur les cellules.....</i>	6
<b><i>I.3 Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) .....</i></b>	<b>7</b>
<b><i>I.4 Biomarqueurs communs à la Sénescence Répllicative et à la SIPS .....</i></b>	<b>8</b>
<i>I.4.1 Les morphotypes.....</i>	8
<i>I.4.2 L'activité <math>\beta</math>-galactosidase associée à la sénescence (S.A <math>\beta</math>-gal).....</i>	9
<i>I.4.3 Apparition de délétions dans l'ADN mitochondrial.....</i>	10
<i>I.4.4 Le raccourcissement des télomères.....</i>	10
<i>I.4.5 Changement du niveau d'expression de gènes.(voir tableau I.1).....</i>	12
<i>I.4.6 Régulation du cycle cellulaire.....</i>	12
a ) Répression de gènes de réponse précoce aux mitogènes (early response genes) :	13
b ) Répression de gènes en phase G <sub>1</sub> /S	13
c ) Répression de cyclines et KDCs	14
d ) Induction de la synthèse d'inhibiteur de KDC : IKDCs	14
<b><i>I.5 Est-ce que la SIPS et la SR sont deux processus similaires ?.....</i></b>	<b>15</b>
<b><i>I.6 La PCR en temps réel (Pour une revue : (Salmon, 2002)) .....</i></b>	<b>17</b>
<i>I.6.1 Introduction.....</i>	17
<i>I.6.2 Principe.....</i>	17
<b><i>I.7 But du mémoire.....</i></b>	<b>19</b>
<b>II MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>20</b>
<b><i>II.1 Techniques de culture cellulaire .....</i></b>	<b>20</b>
<i>II.1.1 Repiquage des fibroblastes WI-38 et SV40 .....</i>	20
<i>II.1.2 Cryoconservation des cellules .....</i>	21
<i>II.1.3 Décongélation et mise en culture des cellules.....</i>	22
<b><i>II.2 Stress subcytotoxiques sur les fibroblastes WI-38 et apparition des biomarqueurs associés à la sénescence.....</i></b>	<b>22</b>



II.2.1 Description des stress.....	23
II.3 Etude de l'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.....	24
II.4 Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.....	25
II.5 Transfection des fibroblastes SV 40.....	26
II.6 Sélection au G418 (généticine).....	28
II.7 Mesure de la cytotoxicité par dosage de protéines.....	28
II.8 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Griffin et al., 1994).....	29
II.9 PCR en temps réel (Real-Time PCR).....	31
II.9.1 Extraction d'ARN total de cultures cellulaires.....	32
II.9.2 Transcription inverse.....	34
II.9.3 Choix des couples d'amorces à partir de la séquence d'ARNm.....	35
II.9.4 Détermination de la concentration optimale d'ADN matrice.....	35
II.9.5 Analyse des résultats.....	37
II.10 Cultures de bactéries.....	37
II.11 Technique de clonage à l'aide du système Gateway.....	38
II.11.1 Construction des vecteurs d'entrées.....	38
a ) Synthèse par PCR du fragment cible	39
b ) Insertion du fragment cible dans le vecteur d'entrée pENTR et transformation des E. Coli Top 10	39
II.11.2 Construction des vecteurs de destination pDEST-40 (réaction LR).....	39
II.12 Mini- préparation d'ADN plasmidique.....	41
II.13 Maxi-préparation d'ADN plasmidique :.....	42
II.14 Restrictions enzymatiques.....	45
II.15 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	45
II.16 Le séquençage.....	46
II.17 Western blot.....	47
II.17.1 Préparation des lysats cellulaires.....	47
<b>III RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>51</b>
III.1 Culture cellulaire et extraction de l'ARN.....	51
III.1.1 Cellules positives pour l'activité S.A $\beta$ -gal.....	52
III.1.2 Mesure du potentiel prolifératif.....	53
III.2 Expression différentielle.....	53



<i>III.2.1 Détermination des efficacités d'amplification .....</i>	<i>54</i>
<i>III.2.2 Quantification des niveaux relatifs de transcrits des gènes d'intérêt.....</i>	<i>54</i>
<b>III.3 Vecteurs d'expression pour la pyruvate kinase, HSP27 et AOP2.....</b>	<b>56</b>
<i>III.3.1 Constructions des vecteurs d'entrée pour la pyruvate kinase .....</i>	<i>57</i>
<i>III.3.2 Constructions des vecteurs de destination (réaction LR) .....</i>	<i>57</i>
<b>III.4 Transfection des fibroblastes WI-38 immortalisés et courbes de</b>	
<b>survie au t-BHP .....</b>	<b>58</b>
<i>III.4.1 Estimation de la survie cellulaire après stress.....</i>	<i>58</i>
<i>III.5 Vérification de la surexpression des protéines par western blot .....</i>	<i>59</i>
<b>IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>60</b>
<b>V BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>64</b>

Liste des Abréviations
------------------------

*Préfixes*

c	Centi- ( $10^{-2}$ )
m	Milli- ( $10^{-3}$ )
$\mu$	Micro- ( $10^{-6}$ )
n	Nano- ( $10^{-9}$ )
p	Pico- ( $10^{-12}$ )
f	Femto- ( $10^{-15}$ )

*Unités*

A	Ampère
°C	Degré Celsius
Ci	Curie
Da	Dalton
g	Gramme
g	Unité de gravité
h	Heure
l	Litre
m	Mètre
M	Molaire
min	Minute
mol	Mole
rpm	Tours par minute
sec	Seconde
U	Unité enzymatique
V	Volt

*Autres*

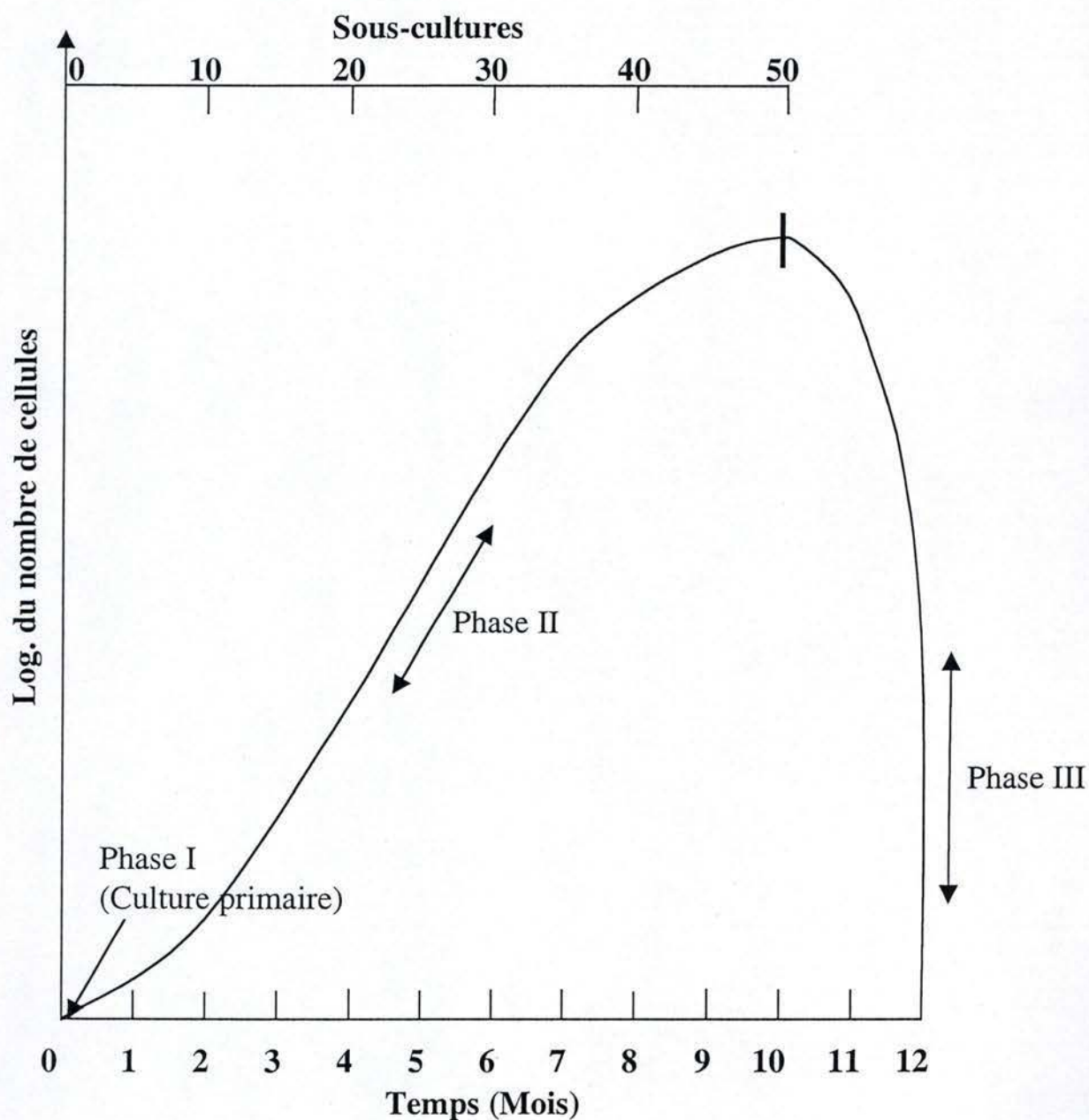
A	Adénine
aa	Acide aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide Désoxyribonucléique mitochondrial
AOP2	l-cys peroxyredoxine
Apo J	Apolipoprotéine J
ApoL	Apolipoprotéine L
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARPC2	Protéine du complexe 2 / 3 relié à l'actine
ATP	Adénosine Triphosphate
C	Cytosine
CMV	Cytomégalovirus
CRP2	Protéine de progression du cycle cellulaire 2
Ct	<i>Threshold Cycle</i> ; Cycle seuil
$\Delta$ Ct	Ct du gène d'intérêt - Ct du gène de référence
$\Delta\Delta$ Ct	$\Delta$ Ct dans la situation test - $\Delta$ Ct dans la situation de référence
DCP	Doublements Cumulatifs de Population
DD RT-PCR	<i>Differential Display</i> basé sur la RT-PCR
ddH <sub>2</sub> O	Eau bi-distillée
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiotréitol



EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ERS	Elément de Réponse au Sérum
EtOH	Ethanol
FHDs	Fibroblastes Humains Diploïdes
FRS	Facteur de Réponse au Sérum
G	Guanine
G418	Généticine
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
gel 2D	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle
<sup>3</sup> H	Tritium
HBP	<i>Highly Basic Protein</i>
HBS	<i>Hepes Buffer Saline</i>
HSP27	Protéine chaperone 27
IKDC	Inhibiteur de Kinase Dépendante de Cycline
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactoside
J0	Cellules jeunes, avant le premier stress
kb	Kilo paires de bases
KDC	Kinase Dépendante de Cycline
KPNB1	Karyophérine bêta-1
LB	Milieu de culture de Luria-Bertani
M83	Protéine transmembranaire M83
MEM	<i>Minimal Eagle Medium</i> ; Milieu de culture minimal d'Eagle
MFI à III	Morphotypes mitotiques de type I à III
MOPS	Acide 3-( <i>N</i> -morpholino)-propanesulfonique
NTC	<i>No Template Control</i> ; Blanc de PCR
oligo dT	Oligonucléotide contenant une répétition de thymines
pb	Paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Réaction de Polymérisation en Chaîne
pH	Potentiel hydrogène
PK2M	Pyruvate kinase
PMF IV à VII	Morphotypes post-mitotiques de type IV à VII
pRb	Protéine de rétinoblastome
PVDF	<i>Polyvinyl difluoride</i>
RL	Radicaux Libres
RNAse	Ribonucléase
RNAsin	Inhibiteur de ribonucléases
RPN2	Ribophorine 2
RT-PCR	Rétro-transcription suivie d'une PCR
<sup>35</sup> S	Isotope 35 du soufre
S.A β-gal	Activité β-galactosidase associée à la sénescence
S100A13	Protéine de liaison au calcium S100A13
S100A4	Protéine de liaison au calcium S100A4, calvasculine ou encore métastatine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIPS	Sénescence Induite Prématûrement par les Stress
SR	Sénescence Répllicative
SV40	Fibroblastes WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40
T	Thymine
T25	Boîte de culture de 25 cm <sup>2</sup>
T75	Boîte de culture de 75 cm <sup>3</sup>
TBE	Tampon Tris-Borate EDTA
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxyde
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffer Saline-Tween</i>
TE	Tampon Tris-EDTA
U.V.	Ultraviolets
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside

# **Introduction**





**Figure I.1 :** Diagramme montrant les trois phases successives de la vie d'une culture de fibroblastes normaux (Hayflick, 1977). La phase I se caractérise par la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. La phase II débute dès le premier repiquage et se caractérise par un taux de croissance exponentiel. Un ralentissement du rythme de croissance survient ensuite, suivi par un arrêt définitif des divisions cellulaires. Cet état, appelé sénescence répliquative, se termine, après une période plus ou moins longue, par la mort des cellules (Phase III).

## **I INTRODUCTION**

### **I.1 Sénescence répllicative et vieillissement cellulaire**

#### **I.1.1 Historique**

Il est, à l'heure actuelle, bien connu que les cellules somatiques normales ne se divisent pas indéfiniment. Ce phénomène, appelé sénescence répllicative, se caractérise par un arrêt définitif des divisions cellulaires après un nombre fini de divisions.

En 1961, Hayflick et Moorhead montrèrent qu'une population de fibroblastes de poumon fœtal humain avait une capacité proliférative limitée *in vitro* à environ 50 passages en culture (DCP : nombre de doublement cumulatif de population) au terme de laquelle les cellules arrêtaient de se diviser et devenaient sénescents (Hayflick *et al.*, 1961). Ce phénomène est maintenant également connu sous le nom de limite de Hayflick.

De plus, ces auteurs établirent que l'évolution d'une culture cellulaire *in vitro* pouvait se diviser en trois phases. La première phase correspond à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine. Durant la seconde phase, qui fait suite au premier repiquage des cellules, les cellules croissent de manière exponentielle. La troisième phase est caractérisée par un ralentissement progressif de la vitesse de croissance des cultures jusqu'à un arrêt irréversible des mitoses qui correspond à la sénescence répllicative. Les cellules en sénescence répllicative restent métaboliquement actives et peuvent être maintenues vivantes en culture durant plusieurs mois. S'en suit enfin la mort cellulaire (**Figure I.1**).

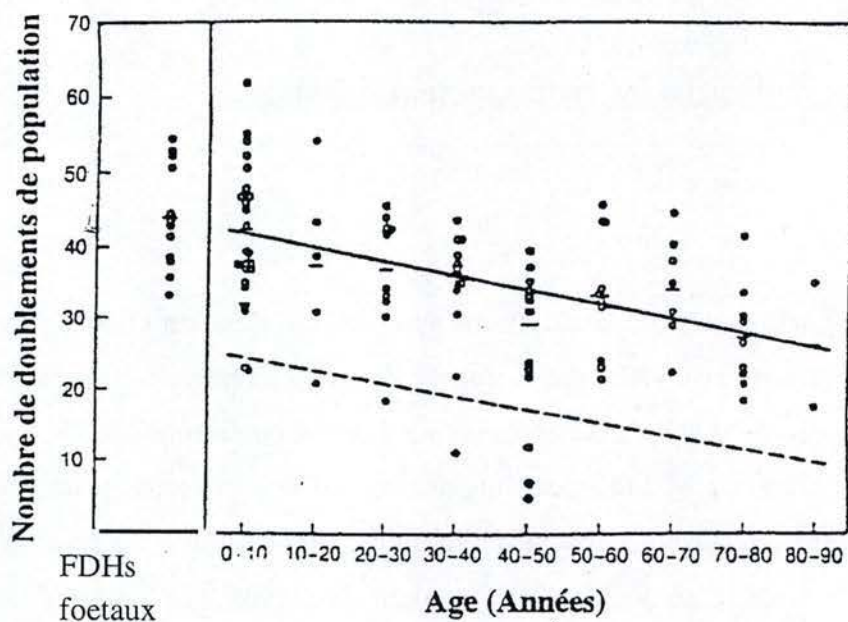
Ce modèle de vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains diploïdes a été élargi à d'autres types cellulaires prolifératifs comme les mélanocytes, les cellules endothéliales, etc. et ce, pour différentes espèces animales.

#### **I.1.2 Sénescence répllicative *in vivo***

La sénescence des cellules prolifératives observée *in vitro* est à mettre en relation avec le vieillissement cellulaire *in vivo*.

Parmi les nombreux arguments en faveur de cette relation *in vitro* / *in vivo*, citons tout d'abord la durée de vie proliférative des fibroblastes qui est inversement proportionnelle à l'âge du donneur. En d'autres termes, le nombre de passages en culture réalisé par des





**Figure I.2:** Relation entre l'âge du donneur et le nombre de doublements de population effectués *in vitro*, pour les fibroblastes humains (Cristofalo *et al.*, 1994).

fibroblastes issus d'un individu âgé sera plus faible que celui de cellules de même type provenant d'un individu jeune (**Figure II.2**). On peut en déduire que les cellules de donneurs âgés entrent plus vite en sénescence que celles d'un donneur jeune et que leur potentiel prolifératif s'épuise donc également *in vivo* (Martin *et al.*, 1970).

D'autre part, la durée de vie proliférative des cellules est directement proportionnelle à la durée de vie maximale de l'animal dont elles sont issues, autrement dit, les cellules venant d'espèces de mammifères à longue durée de vie feront plus de passages en culture que celles qui proviennent d'animaux à durée de vie plus courte (Hayflick, 1977) (**Figure III.3**). De plus, les cellules issues d'individus atteints d'un syndrome de vieillissement accéléré, tel que le syndrome de Werner, ont une durée de vie répllicative fortement réduite *in vitro* (maximum 20 DCPs). Ce syndrome a pour cause une mutation ou une délétion dans un gène codant pour une protéine appartenant à la famille des hélicases. Il en résulte une moins bonne répllication et réparation de l'ADN, ainsi qu'une moins bonne maintenance des séquences télomériques (Pour une revue : (Campisi, 1999)).

## **I.2 Relations entre stress et vieillissement**

### **I.2.1 Introduction**

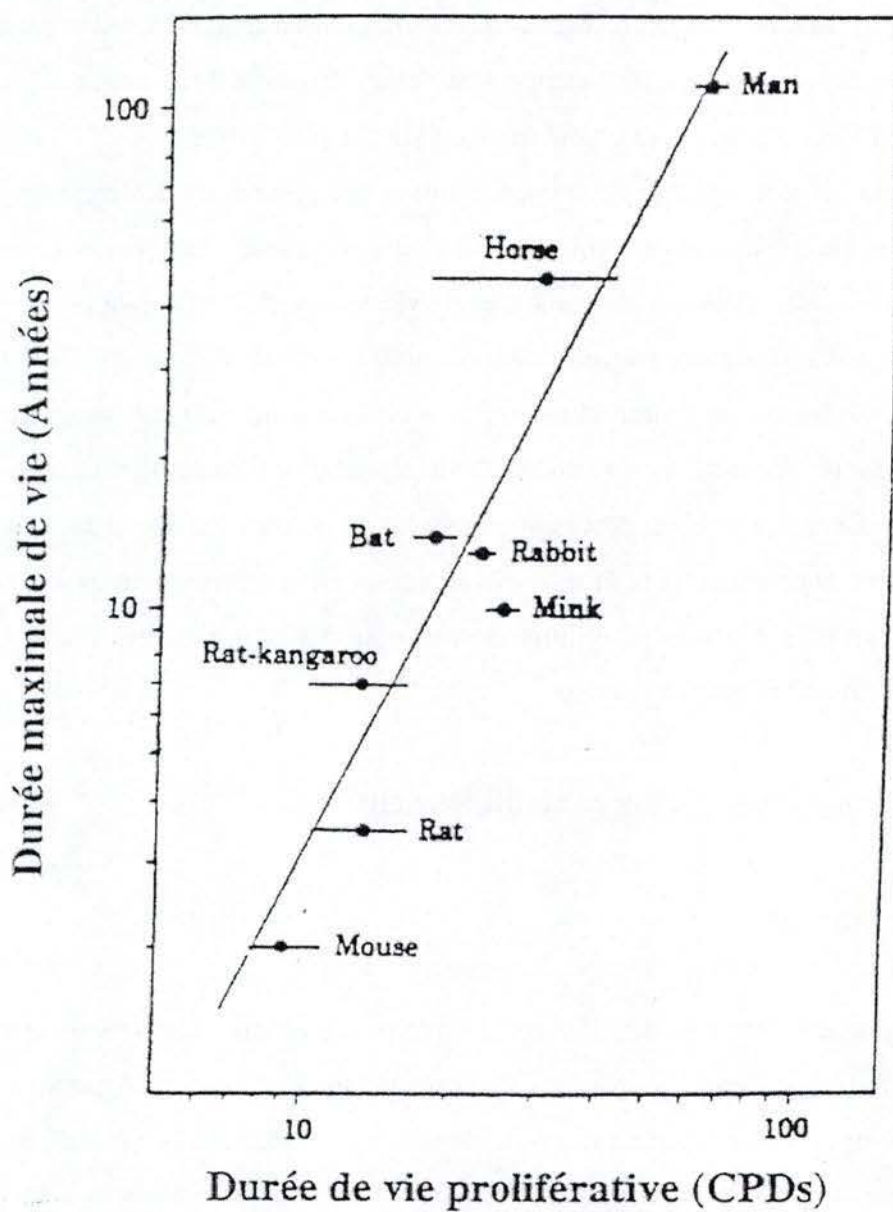
Un stress peut être défini comme toute perturbation potentiellement défavorable d'un facteur environnemental auquel un système vivant est exposé. Au cours de leur vie, les cellules sont soumises à une multitude de stress de natures très variées, tels que des stress osmotiques, oxydatifs, mécaniques, thermiques, etc. auxquels elles font face plus ou moins efficacement en activant ou en inhibant certaines voies métaboliques. C'est ce qu'on appelle la réponse aux stress.

Il existe deux grands types de réponse :

La réponse immédiate, c'est à dire à court terme, impliquant l'activation de cascades de kinases et qui détermine le sort de la cellule. Soit elle meurt par apoptose ou par nécrose, soit elle survit et subit ou non des modifications (Pour une revue : (Remacle *et al.*, 1995)).

La réponse à long terme est généralement étudiée jusqu'à plusieurs jours voire même plusieurs semaines, après des stress d'intensité subcytotoxique.





**Figure I.3 :** Relation entre la durée de vie proliférative des fibroblastes et la durée de vie maximale de l'espèce, pour huit espèces de mammifères (Cristofalo *et al.*, 1994).

### I.2.2 Effet des stress sur les cellules

Selon un modèle largement accepté, on peut distinguer quatre niveaux de stress. Les cellules peuvent adopter divers comportements selon l'intensité des stress auxquels elles sont exposées (Remacle *et al.*, 1995) ; (Toussaint *et al.*, 1995).

#### stress de faible intensité et omniprésents :

Ces stress recouvrent les concentrations basales en radicaux libres, les fluctuations de pH ou de température, etc. Ces stress n'altèrent pas immédiatement la stabilité des systèmes cellulaires. En effet, les dégâts causés sont sans cesse réparés par la cellule. Celle-ci augmente donc momentanément ses activités métaboliques liées, par exemple, à des systèmes de défense, de réparation, puis revient à son niveau basal.

Toutefois, il est possible, lorsque les réparations ne se font pas assez vite, que certaines modifications deviennent irréversibles et s'accumulent. Lorsque le niveau de dommages atteint un seuil critique, où les mécanismes compensatoires sont momentanément dépassés, la stabilité thermodynamique du système cellulaire est perdue et la cellule se retrouve à un niveau d'activité métabolique plus faible où elle réoptimalise ses fonctions, en tenant compte du nombre d'erreurs plus élevé. Ce passage par des niveaux stationnaires successifs d'activité métabolique plus faible représente le vieillissement normal (Toussaint *et al.*, 1992).

#### stress d'intensité modérée :

Dans ce cas, on peut considérer que l'induction de systèmes de défense peut empêcher l'accumulation de dommages supplémentaires, le stress agissant cette fois comme un stimulateur des systèmes de réparation, du moins, tant qu'aucune modification irréversible n'apparaît. Ce phénomène est appelé horméostase (Toussaint *et al.*, 2001).

#### stress d'intensité intermédiaire ou subcytotoxiques :

Ces stress peuvent être chroniques ou répétés, résultant de situations tout à fait anormales, telles que l'inflammation, l'exposition à la radioactivité ou aux U.V., l'excès de production de radicaux libres, etc. Dans ce cas, les mécanismes de réponse aux stress sont momentanément débordés et on peut observer une accumulation de dommages irréversibles, ce qui correspond à une perte de la stabilité cellulaire (Toussaint *et al.*, 1992). Ces conditions mènent soit à une sénescence induite prématurément par les stress, soit au déclenchement de l'apoptose (Toussaint *et al.*, 2002).



stress de forte intensité :

Dans ces conditions , les lésions sont tellement nocives que la cellule meurt par nécrose.

### **I.3 Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)**

Beaucoup de types cellulaires prolifératifs (fibroblastes humains de poumon et de peau, mélanocytes humains, cellules endothéliales, etc.) soumis à des stress subcytotoxiques tels que les ultraviolets (UV),  $H_2O_2$ , *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), éthanol (EtOH), etc. entrent en SIPS.

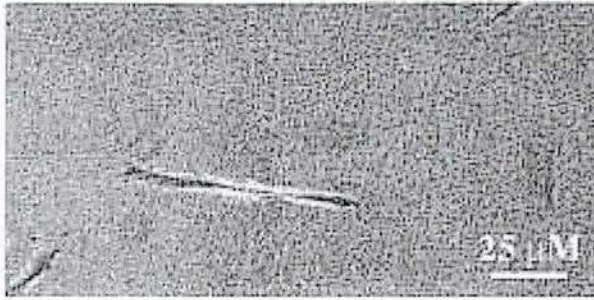
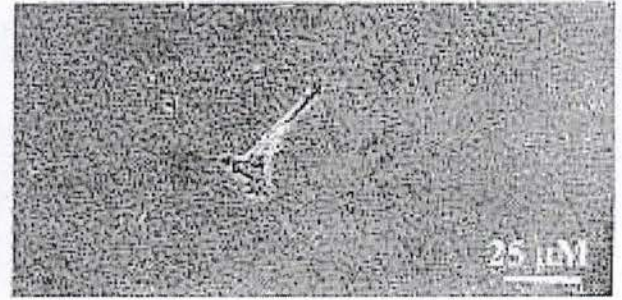
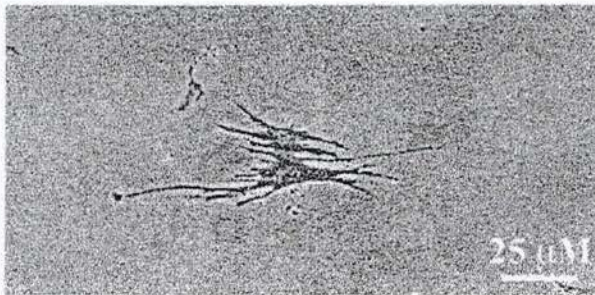
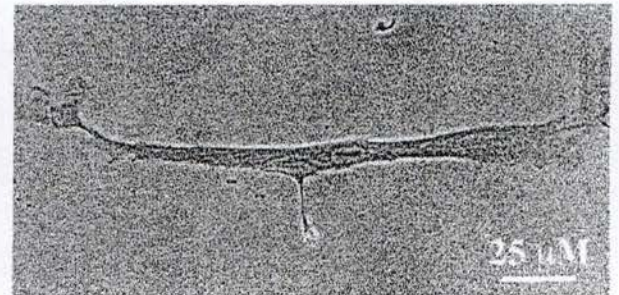
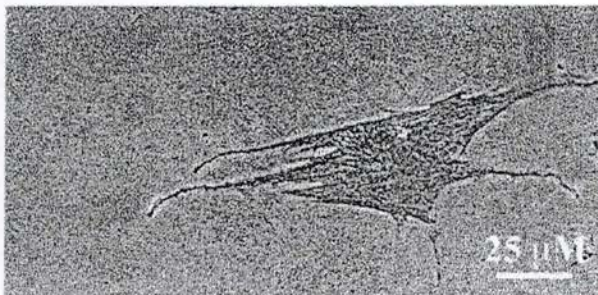
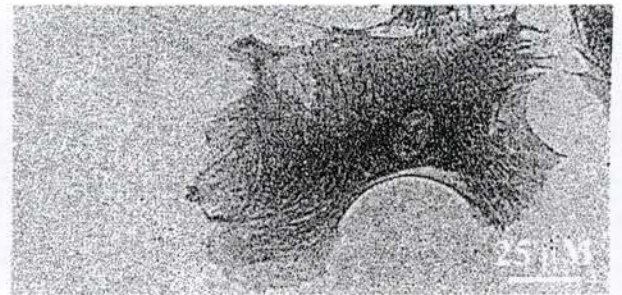
Celle-ci peut être considérée comme une réponse à long terme des cellules prolifératives face à des stress subcytotoxiques. Les cellules en SIPS partagent de nombreux traits communs avec les cellules en sénescence normale.

D'un point de vue expérimental, les stress oxydatifs sont probablement les inducteurs de SIPS les plus utilisés. Deux types de protocoles de stress oxydatifs existent pour augmenter la proportion de fibroblastes humains diploïdes (FHDs) subissant la SIPS. Dans le premier type de protocole, les FHDs subissent un stress léger chronique. Par exemple, on peut exposer les cellules à une hyperoxie prolongée pendant plusieurs semaines (von Zglinicki *et al.*, 1995). Dans le second type de protocole, on réalise des stress subcytotoxiques de courte durée, généralement une à deux heures, répétés ou non. Par exemple on peut exposer les cellules à des stress sous  $H_2O_2$ , *t*-BHP, éthanol, etc. Il est très important de se situer dans des conditions subcytotoxiques pour pouvoir observer les effets à long terme des stress. Dans ces conditions, la SIPS apparaît entre 48 et 72 heures après le(s) stress.

Parmi les stress qui ont été cités, nous nous attarderons principalement sur les stress générés par le *t*-BHP et par l'éthanol. Le *t*-BHP est un peroxyde organique amphiphile pénétrant facilement à travers les membranes biologiques. Arrivé dans le cytoplasme, il génère des espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (Radicaux libres ou RL) par réaction avec des métaux de transition. Ces RL sont capables d'initier la peroxydation lipidique, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité membranaire, mais aussi de causer des dommages à l'ADN comme des coupures simple et double brin, des délétions et des mutations (Ochi *et al.*, 1989).

L'éthanol est un alcool à chaîne très courte. Il est capable de pénétrer dans la double couche lipidique, ce qui la rend plus fluide (Sanchez-Amate *et al.*, 1995). Il déstabilise la



**MF I****MF II****MF III****PMF IV****PMF V****PMF VI**

**Figure I.4 :** Représentation des différents morphotypes observés dans les cultures de fibroblastes humains WI-38. Les fibroblastes humains évoluent au cours de leur vieillissement à travers une séquence de 7 morphotypes. Les trois premiers sont des morphotypes mitotiques (MF I, MF II, MF III) et les 4 suivants sont des morphotypes post-mitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI, PMF VII). Le morphotype PMF VII représente les cellules nécrotiques, il est rarement observé en culture.



membrane plasmique en perturbant l'organisation des phospholipides et des acides gras qui la composent, ce qui a comme conséquence la perturbation des flux ioniques (Mantle *et al.*, 1999).

## **I.4 Biomarqueurs communs à la Sénescence Répllicative et à la SIPS**

### **I.4.1 Les morphotypes**

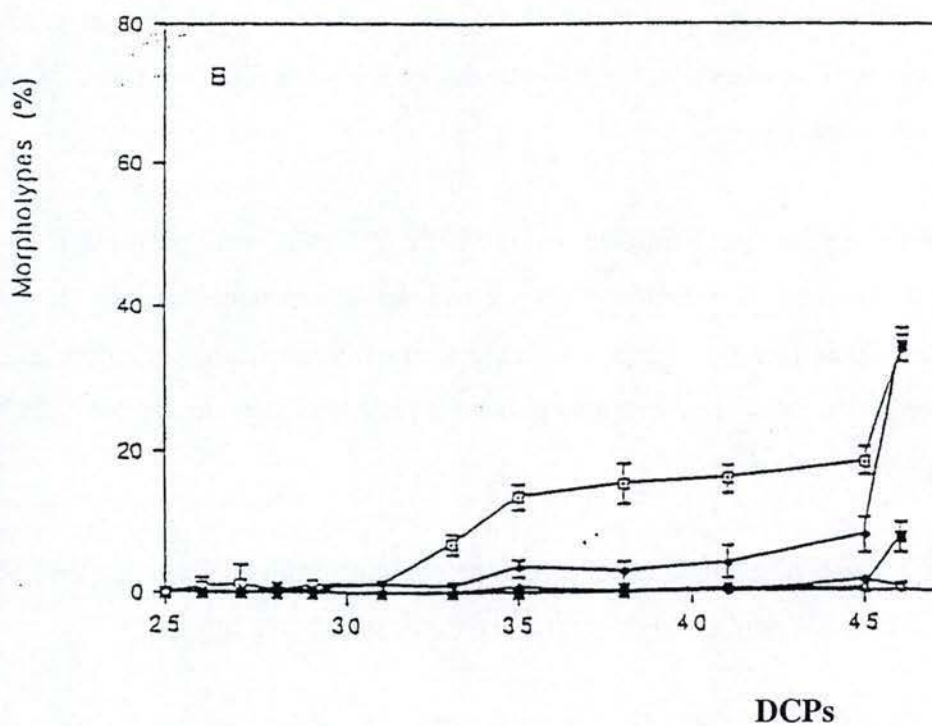
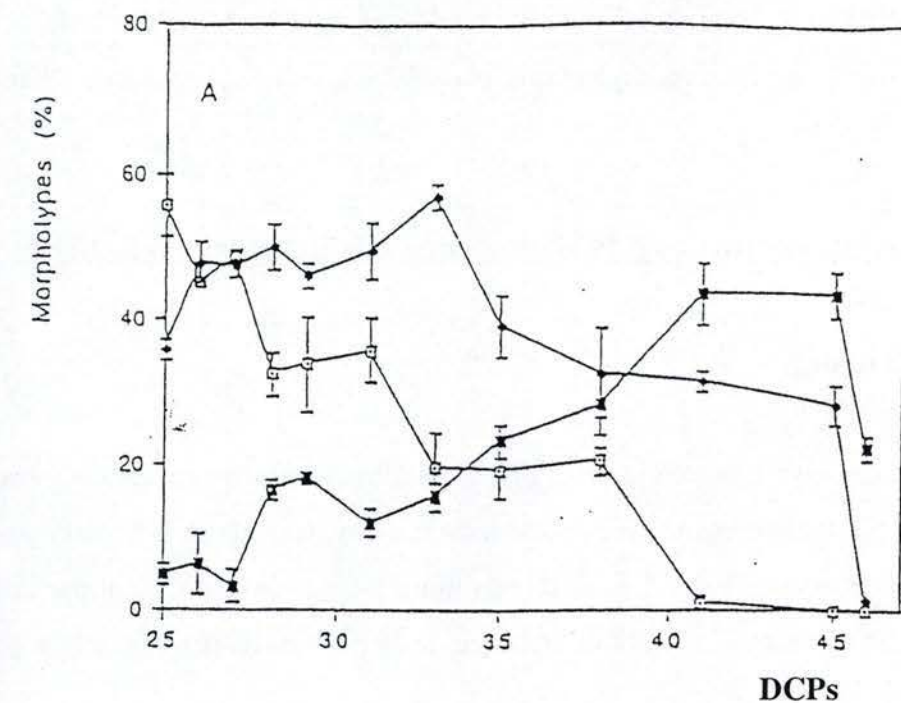
L'équipe de Bayreuther a montré qu'il est possible de classer les fibroblastes humains en 7 classes morphologiquement et biochimiquement distinctes, au cours de leurs passages en culture (Bayreuther *et al.*, 1988). Ces différents morphotypes se distinguent par la forme, la taille et le rapport de surface noyau / cytoplasme de la cellule. Ils peuvent être répartis en 3 groupes :

les morphotypes mitotiques (MFI, II, III) sont caractérisés par une petite taille. Ils se divisent activement. Ils représentent la majorité des fibroblastes d'une culture à faible nombre de passages (= « jeune »).

les morphotypes post-mitotiques (PMFIV, V, VI) sont caractérisés par une morphologie de plus en plus étalée. Ils se retrouvent principalement dans les cultures à nombre élevé de passages (= « âgées »). Ces cellules ont atteint leur nombre maximal de mitoses successives et ne se divisent donc plus mais restent viables durant plusieurs semaines à plusieurs mois(**Figure I.4**).

le morphotype nécrotique (PMFVII) représentant la dégénérescence du PMFVI. Ce morphotype est très rarement observé car il a une durée de vie très limitée.

La proportion des différents morphotypes dépend directement de l'âge de la culture, exprimé en nombre de doublements cumulatifs de population (DCPs). Plus le nombre de DCPs augmente, plus la proportion des morphotypes post-mitotiques augmente aux dépens des morphotypes jeunes. (**Figure I.5**). Ces critères morphologiques ont été utilisés afin d'analyser l'effet des stress subcytotoxiques sur le vieillissement *in vitro*. Ainsi, il fut démontré qu'une culture de fibroblastes jeunes, stressée au *t*-BHP, voyait sa population de



**Figure I.5:** (a) Proportions de fibroblastes mitotiques WI-38 en fonction du nombre de passages en culture, MFI (carré blanc), MFII (losange noir) et MFIII (carré noir).  
 (b) Proportions des fibroblastes post-mitotiques WI-38 en fonction du nombre de passages en culture, PMFIV (carré blanc), PMFV (losange noir) et PMFVI (carré noir).



morphotypes jeunes diminuer au profit d'une augmentation des morphotypes âgés dans les 48 heures après les stress (**Figure I.6**). De plus, cette évolution vers des morphotypes post-mitotiques dépend de la concentration en molécule stressante ainsi que de la durée et du nombre de stress (Toussaint *et al.*, 1992).

Bayreuther et ses collaborateurs ont également montré que leur modèle de morphotypes était applicable *in vivo*. En effet, après analyse de biopsies de peau humaine, ils observèrent que la proportion des morphotypes évolue vers des morphotypes âgés en fonction de l'âge du donneur (**Figure I.7**).

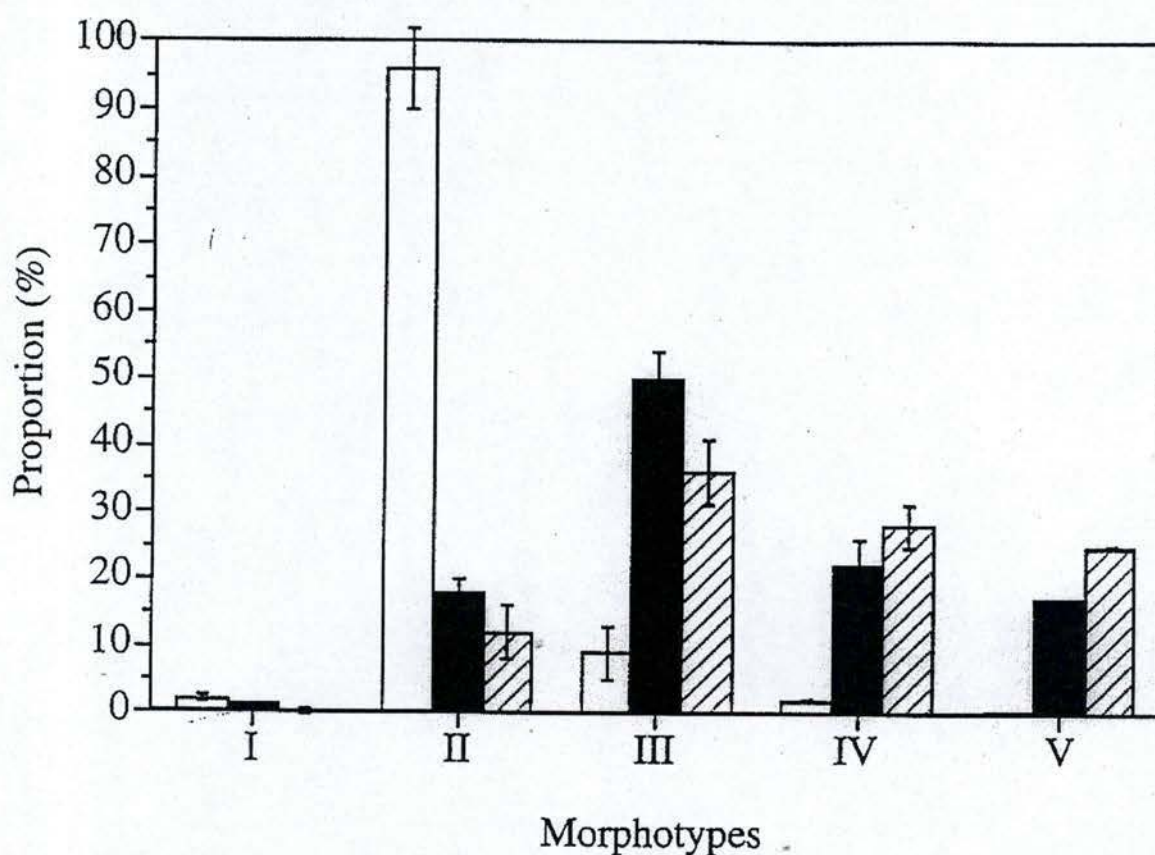
#### **I.4.2 L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (S.A $\beta$ -gal)**

L'équipe de J. Campisi (Dimri *et al.*, 1995) a mis en évidence une activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase spécifique aux cellules en sénescence, abrégée S.A  $\beta$ -gal. Ce marqueur enzymatique représente un outil remarquable pour la détection de cellules sénescents dans une culture.

L'activité de cette enzyme lysosomiale est détectable par histochimie à pH 6 dans les cellules sénescents grâce au X-gal, un substrat artificiel de l'enzyme, qui, après clivage, colore les cellules en bleu. Il est essentiel que la révélation de cette activité ait lieu à pH 6 car il existe une activité  $\beta$ -galactosidase lysosomiale, détectable à un pH optimal de 4, à la fois chez les cellules jeunes et âgées. On pense actuellement que cette activité enzymatique apparaît suite à un élargissement du pic de pH optimal, dû à l'augmentation de la taille des lysosomes, dans les cellules vieilles, permettant ainsi une accumulation de l'enzyme dont l'activité devient détectable dans une gamme de pH plus élargie (Kurz *et al.*, 2000).

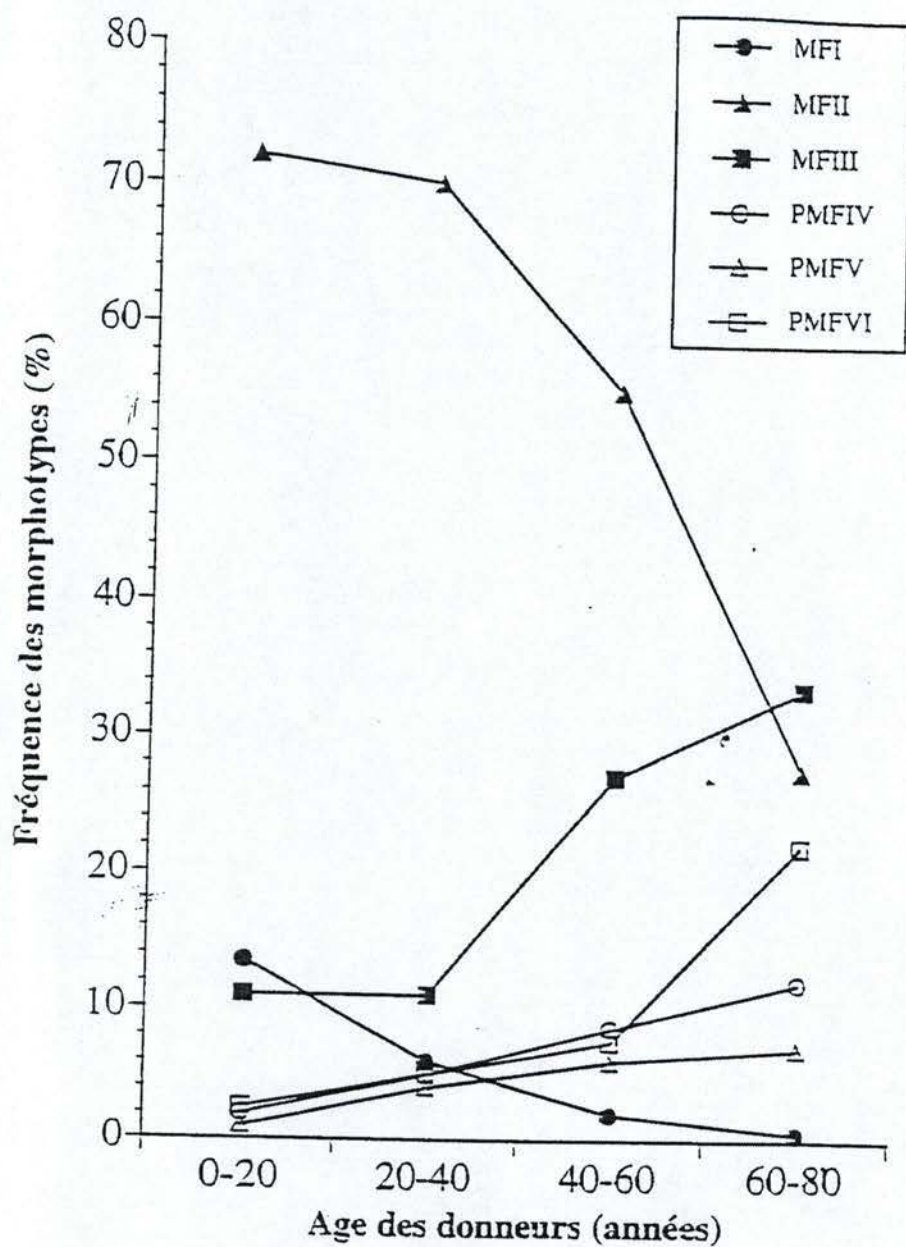
La proportion de cellules positives pour l'activité S.A  $\beta$ -gal augmente au cours des DCPs, atteignant plus de 80% de cellules positives chez les cellules sénescents.

On observe également une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -Gal dans les cellules à 48 heures après cinq stress au *t*-BHP. Cette proportion est voisine de celle observée aux environs de 85% de durée de vie répliquative (Dumont *et al.*, 2000). (**Figure I.8**). Des marquages histochimiques qui mettent en évidence l'activité S.A  $\beta$ -gal sur des échantillons de peau de donneurs humains d'âges différents montrent que la proportion de cellules qui présentent cette activité, croît avec l'âge du donneur (Dimri *et al.*, 1995) (**Figure I.9**). Enfin, il existe une corrélation entre l'activité S.A  $\beta$ -Gal et les différents

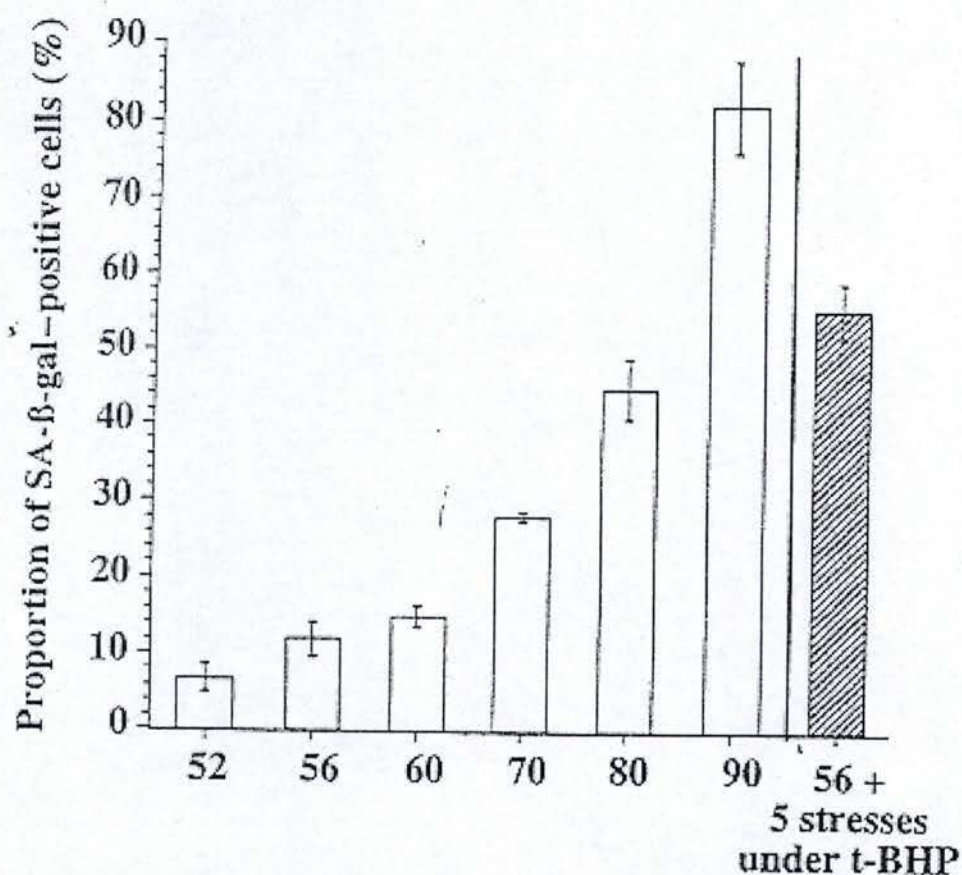


**Figure I.6 :** Proportions des différents morphotypes observés dans des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes ( 27 DCP ) représentés par les colonnes blanches, âgés ( 43 DCP ) représentés par les colonnes noires, et de fibroblastes jeunes deux jours après avoir subi 5 stress successifs de 1h en présence de t-BHP 100  $\mu$ M, illustrés par les colonnes hachurées (Toussaint, O. *et al.*, 1998).





**Figure I.7 :** Graphe montrant les changements de proportions des différents morphotypes dans des populations de fibroblastes de peau isolées de biopsies, pour des donneurs humains répartis en 4 tranches d'âges. (Bayreuther *et al.*, 1988).

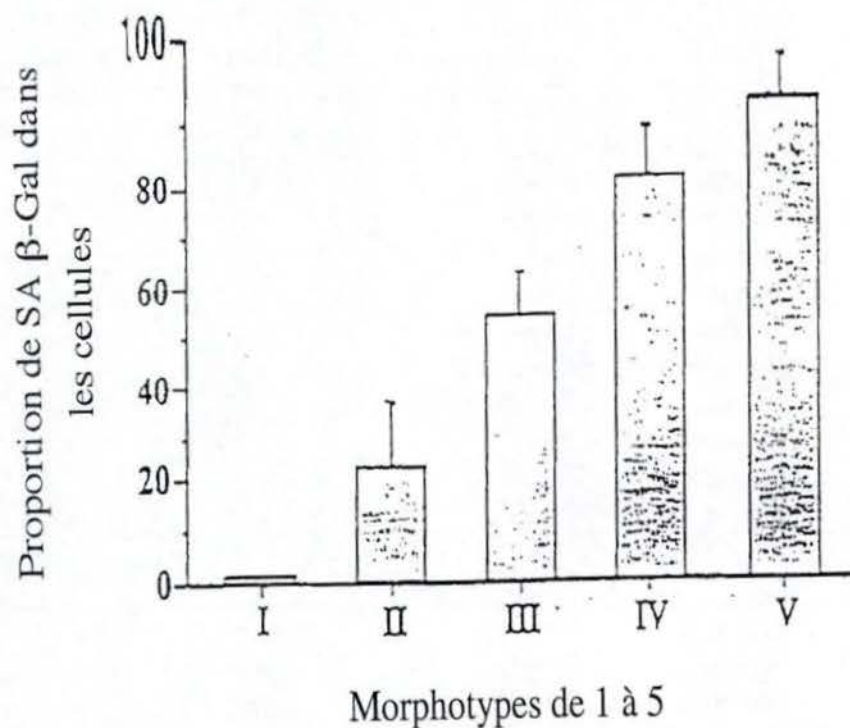


**Figure I.8 :** Effet de stress répétés au *t*-BHP sur la proportion de cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -galactosidase. Données provenant de fibroblastes ayant atteint 52 à 90% de leur potentiel prolifératif (colonnes blanches) et de fibroblastes à 56% de leur potentiel prolifératif soumis à 5 stress d'1h sous 30  $\mu$ M de *t*-BHP (colonne hachurée). Les valeurs représentées sont les proportions moyennes  $\pm$  la déviation standard et ont été obtenues à partir de 4 expériences (Dumont, P. *et al.*, 2000).



Donneur	Age (années)	Sexe	Emplacement	Marquage SA $\beta$ -Gal	
				Epiderme	Derme
Jeunes					
1	37	Féminin	Joue	+	-
2	38	Féminin	Epaule	-	-
3	37	Féminin	Nez	$\pm$	-
4	20	Féminin	Lèvre	-	-
5	39	Féminin	Lèvre	++	-
6	31	Masculin	Cuir chevelu	-	-
7	31	Féminin	Cuir chevelu	-	-
8	38	Masculin	Joue	$\pm$	-
9	33	Masculin	Nez	+	-
10	31	Masculin	Tempe	$\pm$	-
Vieux					
1	78	Féminin	Nez	+++	++
2	69	Masculin	Tempe	$\pm$	++
3	73	Féminin	Nez	++	++
4	76	Masculin	Bras	+++	+++
5	81	Féminin	Lèvre	+++	-
6	70	Féminin	Lèvre	+++	++
7	81	Masculin	Cou	+++	+++
8	73	Masculin	Tempe	+++	+++
9	75	Masculin	Cuir chevelu	++	+++
10	90	Masculin	Cuir chevelu	$\pm$	+++

**Figure I.9:** Marquages histochimiques mettant en évidence l'activité SA  $\beta$ -gal réalisés sur des échantillons de peau de donneurs d'âges différents (Dimri *et al.*, 1995). Des sections (4  $\mu$ m) de peau des différents échantillons ont été marqués pour mettre en évidence l'activité SA- $\beta$ -gal et examinées au microscope optique. Au moins cinq coupes ont été examinées par donneur. Les donneurs ont été divisés en deux groupes d'âges : de 20 à 39 ans (jeunes) et de 69 à 90 ans (vieux). - : aucune cellule positive;  $\pm$  : 1 cellule positive; + : 2 à 4 cellules positives; ++ : plusieurs cellules positives (derme) ou noyau de cellules positives (épiderme); +++ : cellules positives dans toutes les sections du derme, de nombreux noyaux de cellules positives dans l'épiderme.



**Figure I.10 :** Proportions de fibroblastes WI-38 positifs pour l'activité S.A.-β-gal pour les morphotypes de I à V (Toussaint, O. *et al.*, 2000b).



morphotypes. Une augmentation de l'activité est liée à un passage vers des morphotypes plus âgés. ((Dumont *et al.*, 2000) (**Figure I.10**).

#### **I.4.3 Apparition de délétions dans l'ADN mitochondrial**

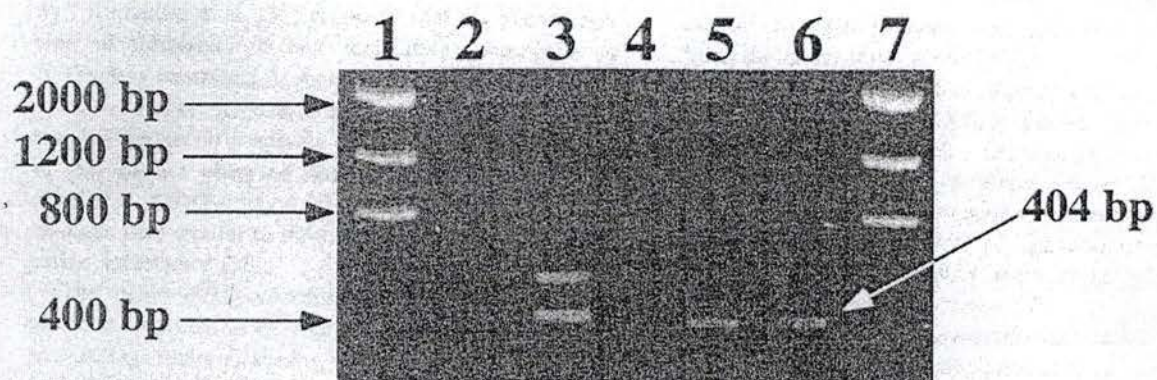
Une majeure partie de l'énergie indispensable au métabolisme cellulaire est fournie par l'ATP régénéré suite à l'activité de la chaîne de transport d'électrons se situant dans la membrane interne des mitochondries. Ces organites disposent de leur propre génome, long de 16,5 kb, dont les gènes codent pour des protéines mitochondriales essentielles pour la production d'ATP. Au cours du vieillissement cellulaire, des délétions, ainsi que des mutations ponctuelles, apparaissent dans le génome mitochondrial. La délétion la plus commune, de 4.977 pb, apparaît dans les cellules sénescents et dans les cellules jeunes en SIPS induite par le *t*-BHP (Dumont *et al.*, 2000) (**Figure I.11**). Le niveau de délétions dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) est aussi plus élevé dans les échantillons de peau exposés au soleil que dans les échantillons non exposés. Ce n'est pas tant la présence d'une délétion qui est dangereuse, mais plutôt sa fréquence d'apparition dans une cellule ou un tissu. (Lee *et al.*, 1997) (Ozawa *et al.*, 1991). On constate que l'accumulation de délétions dans l'ADNmt est plus élevée dans les tissus très actifs, consommant beaucoup d'oxygène et générant donc beaucoup plus de RL (Dumont *et al.*, 2000).

#### **I.4.4 Le raccourcissement des télomères**

Les télomères sont les extrémités des chromosomes. Ils se caractérisent par la répétition d'une séquence consensus (TTAGGG chez l'homme) un très grand nombre de fois (Meyne *et al.*, 1989). Ces répétitions forment une structure tridimensionnelle avec laquelle de nombreuses protéines interagissent ; on parle de télosome.

Les télomères sont essentiels pour la stabilité chromosomique. Ils empêchent la dégradation des extrémités chromosomiques, la fusion des chromosomes, ainsi que la recombinaison d'éléments télomériques très courts, qui, après la mitose, générerait des cassures simples ou doubles dans l'ADN, reconnues comme dommages.

Le modèle semi-conservatif de réplication de l'ADN et de la capacité de l'ADN polymérase de ne synthétiser que dans le sens 5' en 3' de l'ADN en présence d'une amorce d'ARN explique ce phénomène de raccourcissement, appelé « problème de réplication



**Figure I.11 :** Détection de la délétion mitochondriale commune de 4977 pb par PCR emboîtée.

- Puits 1 et 7 : représentent le marqueur de poids moléculaire.
- Puits 2 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 55% de leur potentiel de prolifération.
- Puits 3 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 55% de leur potentiel de prolifération et ayant subi 5 stress d'1h sous 30  $\mu$ M de *t*-BHP.
- Puits 4 : contrôle négatif (PCR réalisée sans ADN matrice).
- Puits 5 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 95% de leur potentiel de prolifération.
- Puits 6 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 95% de leur potentiel de prolifération. La présence de la délétion mitochondriale de 4977 pb donne un produit de 404pb, indiqué par la flèche. Notons une seconde délétion apparaissant sur la piste 3 (Dumont, P. *et al.*, 2000).



terminale ». En effet, durant la réplication de l'ADN, un des deux brins est répliqué de façon continue de 5' en 3', tandis que l'autre est synthétisé sous forme de fragments discontinus, appelés fragments d'Okazaki, nécessitant à chaque fois une nouvelle amorce. La synthèse étant terminée, toutes les amorces sont enlevées et les « trous » laissés sont comblés, sauf à l'extrémité 5'. Le brin discontinu est, de ce fait, plus court de quelques paires de bases que sa matrice: on obtient une extrémité 3' protrudante. C'est ce mécanisme qui serait à l'origine du raccourcissement télomérique observé (**Figure I.12**).

Les télomères se raccourcissent au fur et à mesure des DCPs à raison d'environ 50 pb / DCP (Harley *et al.*, 1990). Il est, à l'heure actuelle, indiscutable que ce raccourcissement au fil des passages en culture soit un des mécanismes universels expliquant la limite de prolifération des cellules somatiques et l'entrée de ces cellules en sénescence répliative.

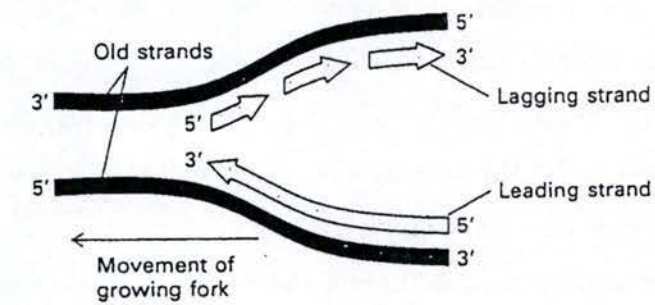
Un argument en faveur de cette théorie est que les cellules germinales et immortelles (cellules cancéreuses) ne subissent pas ce phénomène de raccourcissement des télomères car elles possèdent une enzyme, la télomérase, capable d'ajouter des séquences TTAGGG à partir d'une matrice d'ARN apportée par l'enzyme (Greider *et al.*, 1996). La télomérase est une ribonucléoprotéine contenant un ARN d'environ 9 à 30 pb complémentaires de l'ADN télomérique (**Figure I.13**).

De plus, des expériences sur des fibroblastes humains normaux ont montré qu'il était possible de restaurer l'activité télomérase de ces cellules en les transfectant de manière stable avec un vecteur comportant l'ADNc codant pour la sous-unité catalytique de l'enzyme. Ces auteurs ont observé que la durée de vie maximale de ces cellules augmentait considérablement et que la longueur de leurs télomères était maintenue (Bodnar *et al.*, 1998).

Enfin, les raccourcissements télomériques pourraient être perçus comme des dommages à l'ADN, ce qui entraînerait l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> par des mécanismes expliqués plus bas.

Le raccourcissement télomérique a aussi été démontré *in vivo* : à la naissance, la longueur des télomères est de 10 à 15 kb chez les fibroblastes humains, puis elle diminue progressivement (Hastie *et al.*, 1990); (Allsopp *et al.*, 1992). Lorsque l'on examine des cellules de donneurs d'âges différents, on observe que plus l'âge augmente, plus les télomères sont courts. Le raccourcissement est d'environ 15 pb / an (Allsopp *et al.*, 1992).

Les cellules en SIPS déclenchée par le *t*-BHP ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> montrent aussi un raccourcissement accéléré des télomères (Dumont *et al.*, 2001).



#### Lagging-strand synthesis

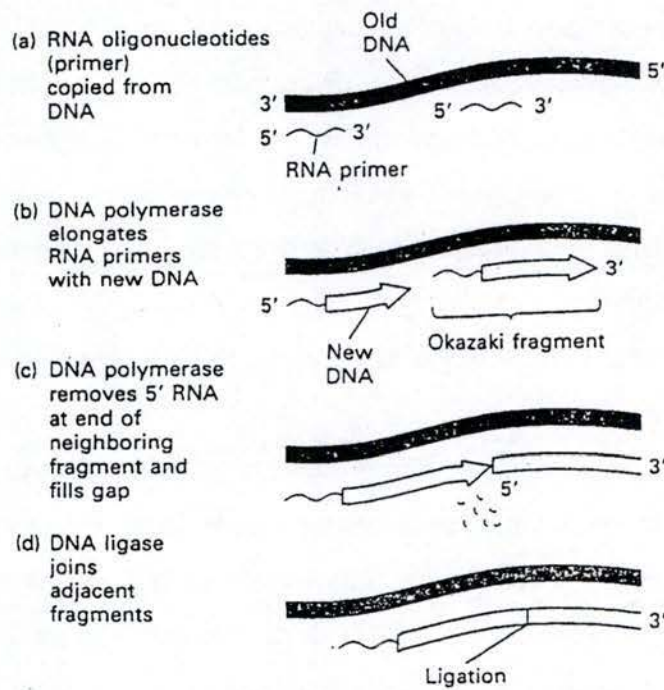
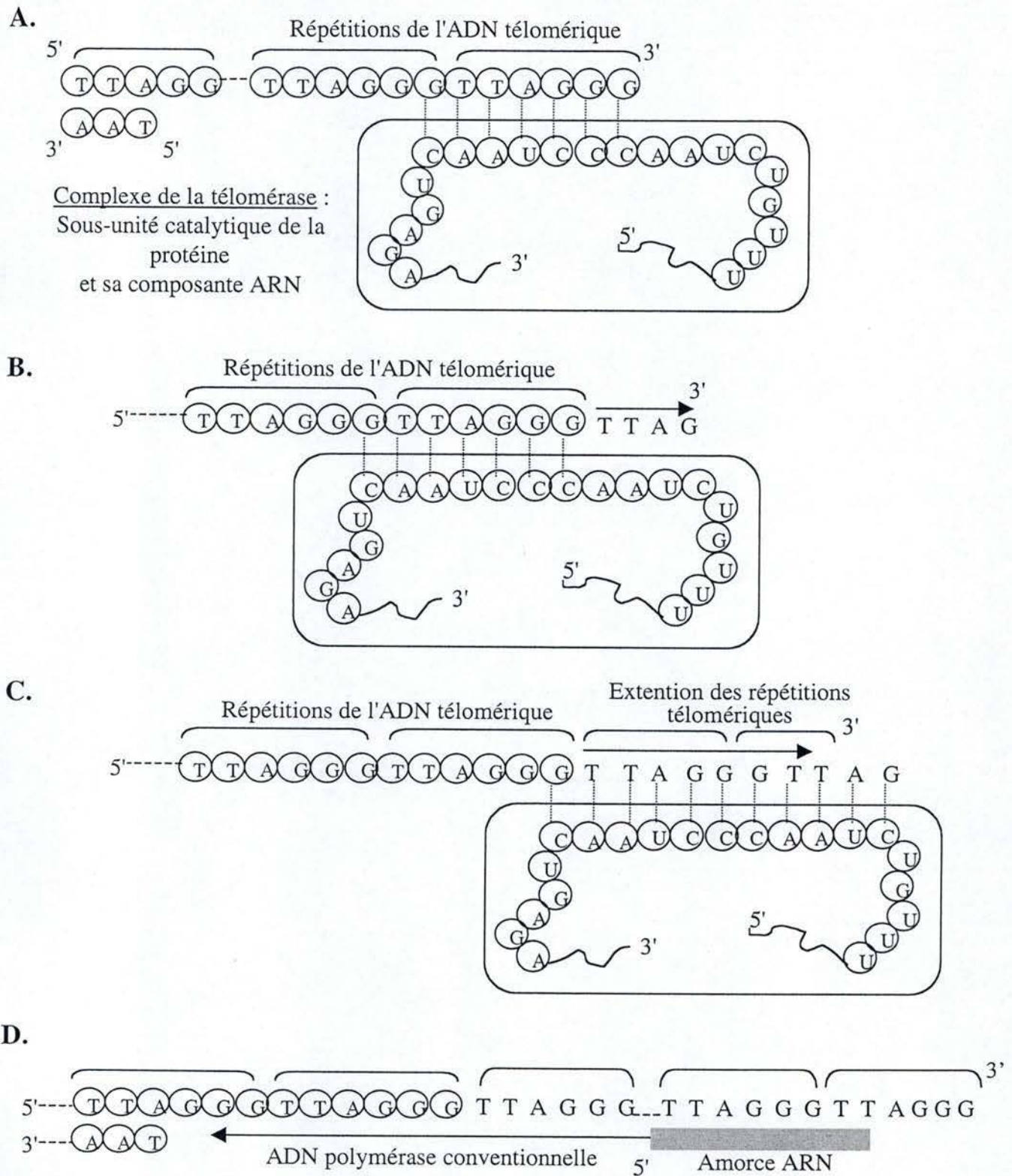


Figure I.12: Schéma de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase (Lodish *et al.*, 1995).





**Figure I.13 :** Modèle d'élongation des extrémités chromosomiques par la télomérase (Urquidi *et al.*, 2000). (A) La télomérase s'hybride au télomère via l'extrémité 3' de son ARN au niveau de la structure simple-brin la plus distale. (B) La télomérase catalyse l'extension du brin télomérique riche en G sur toute la longueur de sa molécule d'ARN. (C) L'enzyme se déplace vers l'extrémité et catalyse une nouvelle élongation. Ce processus se répète plusieurs fois résultant en une élongation dans le sens 5' vers 3'. (D) Le brin complémentaire (riche en C) est synthétisé par extension d'une amorce ARN par une ADN polymérase conventionnelle.



#### I.4.5 Changement du niveau d'expression de gènes.(voir tableau I.1)

Plus de 80 gènes voient leur niveau d'expression varier durant le vieillissement *in vitro*. Ces gènes codent pour des facteurs de croissance, des inhibiteurs de croissance, des récepteurs, des composants de la matrice extracellulaire, des protéines intervenant dans la synthèse, la réparation et la structure de l'ADN, des régulateurs du cycle cellulaire, etc.

Nous nous contenterons de citer certains de ces gènes dont le niveau d'expression augmente après 5 stress oxydatifs subcytotoxiques sous *t*-BHP et lors de la sénescence répliative.

Parmi ces gènes, on trouve la fibronectine et l' $\alpha$ -1 procollagène, composants de la matrice extracellulaire, impliqués dans l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette et la migration cellulaire. La fibronectine interviendrait dans les changements morphologiques, observés lors de la SR et de la SIPS.

L'ostéonectine contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéases. Elle est aussi connue pour inhiber l'entrée en phase S du cycle cellulaire.

L'apolipoprotéine J (ApoJ) est, elle aussi, induite par des stress et sa surexpression entraîne une protection contre les stress (Dumont *et al.*, 2000) (**Figure I.14**).

#### I.4.6 Régulation du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en 4 étapes : G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M. Toutes les étapes sont étroitement régulées par une série de protéines appartenant à la famille des sérine-thréonine kinases, dites kinases dépendantes de cycline (KDC). L'activité de ces kinases nécessite une association à une sous-unité régulatrice qui s'appelle une cycline. Différents complexes cycline-KDC sont exprimés et activés au cours des diverses phases du cycle. (**Figure I.15 et tableau I.2**).

A la fin de la phase G<sub>1</sub> se trouve le point de restriction. Ce moment est déterminant pour la poursuite ou non du cycle jusqu'en phase S, où l'ADN va être dupliqué. Si ce point de non retour est franchi, la cellule ne répond plus aux signaux inhibiteurs et n'a pas besoin d'éléments stimulateurs pour rentrer en phase de division cellulaire (M) (Pardee, 1974).

Les cellules sénescents sont incapables d'entrer en phase S. Leur cycle est bloqué en G<sub>1</sub> suite à différentes modifications qui apparaissent tout au long de cette étape. Seuls les faits les plus importants sont repris ci-dessous.



Gène/protéine	Description	Modification avec la sénescence
<i>Inhibiteurs de croissance</i>		
EPC-1/PEDF (Early PDL cDNA-1/Pigment epithelial derived factor)	Inhibiteur de la croissance; marqueur de la phase G <sub>0</sub> Facteur de différenciation; facteur neurotrophique	Sous expression de l'ARNm et de la protéine
HIC-5 (Hydrogene peroxyde inducible clone-5)	Inductible par l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; inhibiteur de la croissance	Surexpression de l'ARNm
p33 <sup>ING1</sup>	Inhibiteur de la croissance	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
Prohibitine	Inhibiteur de la croissance; suppresseur de tumeur	Perte de modifications post-traductionnelles
Protéine du rétinoblastome (pRb)	Inhibiteur de la croissance; suppresseur de tumeur	Absence de phosphorylation
Statine	Protéine nucléaire; s'associe à pRb	Surexpression de la protéine
<i>Facteurs de croissance/cytokines</i>		
Héréguline	Activateur du récepteur à tyrosine kinase ERBB2	Surexpression de l'ARNm
IGF-1 (Insulin-like growth factor-I)	Facteur de croissance	Sous-expression de l'ARNm
Interféron-β	Cytokine; interfère avec l'action mitogénique des facteurs de croissance	Surexpression de la protéine
Interféron-γ	Cytokine; interfère avec l'action mitogénique des facteurs de croissance	Surexpression de l'ARNm
Interleukine-1α et -β	Cytokine; médiateur de la résorption osseuse; inflammation et immunité	Surexpression de l'ARNm
Interleukine-6	Cytokine; réponse de phase aiguë dans le foie; favorise la croissance des hybridomes; activité antivirale	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
<i>Récepteurs/Binding proteins</i>		
Antigène CD44	Molécule d'adhésion cellulaire; glycoprotéine transmembranaire qui lie l'hyaluronate et l'ostéopontine	Surexpression de l'ARNm
EGF-R (Récepteur au facteur de croissance épidermique)	Récepteur de facteur de croissance	Perte de l'activité tyrosine kinase
IGFBP-3 (Insulin-like growth factor binding protein-3)	Lie la protéine IGF-1	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
IGFBP-5 (Insulin-like growth factor binding protein-5)	Lie la protéine IGF-1	Surexpression de l'ARNm
<i>Inductible par les interférons</i>		
2-5 AS (2',5' oligoadénylate synthétase)	Polymérise l'ATP en oligomères liés en 2'-5'	Surexpression de l'ARNm
IFI-6-16 (Protéine 6-16 inducible par l'interféron)	Activé par IFN-α et IFN-β mais pas par IFN-γ	Surexpression de l'ARNm



### Régulation du cycle cellulaire

CDC2/CDK1 (Kinase dépendante des cyclines-1)	Rôle dans la progression à travers les phases G2 et M	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
CDK2 (Kinase dépendante des cyclines-2)	Rôle dans la progression à travers les phases G1/S et S	Sous-expression de l'ARNm; réduction de la phosphorylation
CDK4 (Kinase dépendante des cyclines-4)	Rôle dans la progression à travers la phase G1	Sous-expression de l'ARNm ou pas de changement suivant la lignée cellulaire de HDFs
Cycline A	Composant régulateur des CDKs	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Cycline B		
Cycline D1	Composant régulateur des CDKs	Sous-expression de l'ARNm ou surexpression suivant la lignée cellulaire de HDFs
Cycline E		
Cycline D3	Composant régulateur des CDKs	Diminution de l'induction par le sérum
Cycline H	Composante de la cyclin-activating kinase (CAK)	Sous-expression de l'ARNm
p16 <sup>INK4/CDKN2</sup>	Inhibiteur de CDK4 et CDK6	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
p21 <sup>S<sub>DI-1</sub>/CIP1/WAF1</sup>	Inhibiteur des complexes cyclines-CDKs	Surexpression de l'ARNm et de la protéine

### ADN/Synthèse des protéines, réparation et structure

PCNA (Antigène nucléaire de prolifération cellulaire)	Cofacteur de la polymérase $\delta$	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Polymérase $\alpha$	Synthèse de l'ADN	Sous-expression de la protéine
RRM1/RRM2 (Ribonucléotide Réductase (sous-unités M1 et M2))	Production de déoxyribonucléotides pour la synthèse d'ADN	Sous-expression de l'ARNm
Thymidine kinase	Conversion de la thymidine en thymidylate (thymidine-5'-monophosphate, TMP) ; étape de la biosynthèse du nucléotide	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Thymidylate synthétase	Méthylation de la 2'-déoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) pour former le TMP; étape de la biosynthèse du nucléotide	Sous-expression de l'ARNm
H1, H2a, H2b, H3, H4 (Histones)	Structure de la chromatine	Sous-expression de l'ARNm
PARP/ADPRT (Poly(ADP-ribose) polymérase/ADP ribosyltransférase)	Protéine associée à la chromatine; rôle dans la réparation des dommages à l'ADN	Sous-expression de la protéine
Ku autoantigène	Hélicase: rôle dans la reconnaissance des dommages à l'ADN	Diminution de l'abondance de la protéine dans le noyau
Topoisomérase I	Modifie la topologie de l'ADN	Sous-expression de l'ARNm/baisse d'activité
Dihydrofolate réductase	Catalyse la réduction du folate en dihydrofolate étape de la synthèse des acides aminés, des purines et du thymidylate	Sous-expression de l'ARNm

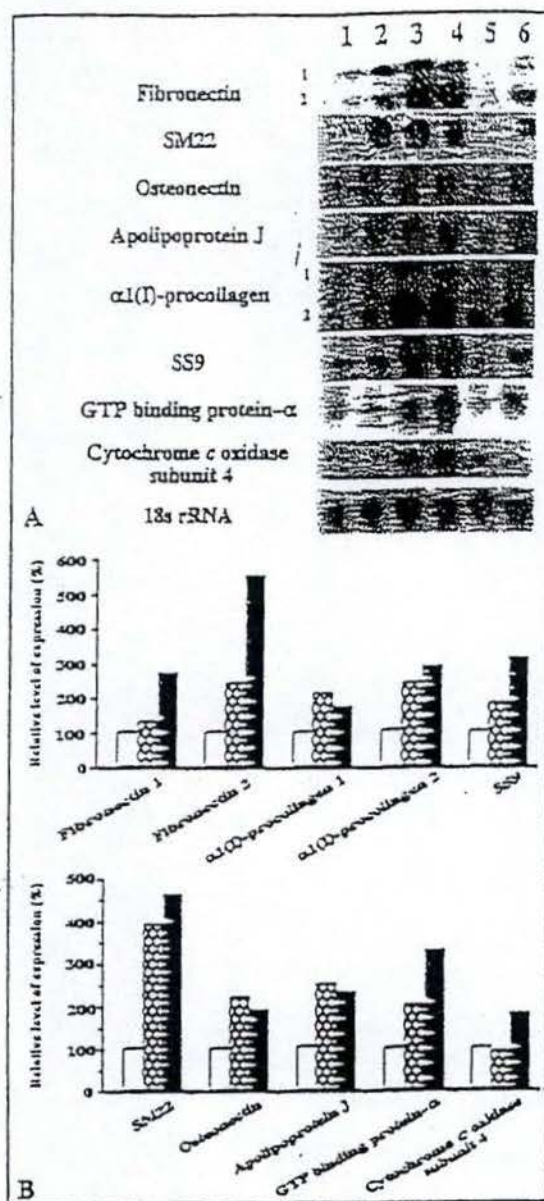


EF-1 $\alpha$ (Facteur d'elongation-1 $\alpha$ )	Synthèse des protéines	Sous-expression de la protéine
L5, L7, P1, S3, S6, S10	Protéines ribosomales	Sous-expression de l'ARNm
<i>Matrice extracellulaire</i>		
Collagène $\alpha$ 1(I)	Composant de la matrice extracellulaire	Surexpression ou sous-expression de l'ARNm
Collagène $\alpha$ 2(I)	Composant de la matrice extracellulaire	Sous-expression de l'ARNm
Collagène $\alpha$ 1(III)	Composant de la matrice extracellulaire	Sous-expression de l'ARNm
Elastine	Composant majeur des fibres élastiques	Sous-expression de l'ARNm
Fibronectine	Composant de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm
Chaîne $\alpha$ de la laminine	Glycoprotéine de la membrane basale	Sous-expression de l'ARNm
<i>Protéases de la matrice extracellulaire</i>		
CGN/MMP1 (Collagénase)	Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire.; remodelage de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
PLAT/t-PA (Tissue-type plasminogen activator)	Sérine protéase qui active le plasminogène en plasmine	Surexpression de la protéine
PLAU/u-PA	Activateur du plasminogène urinaire	Surexpression de la protéine
STMY/MMP3 (Stromélysine)	Remodelage de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
<i>Inhibiteurs de protéases de la matrice extracellulaire</i>		
PAI-1, PAI-2 (Plasminogen activator inhibitors-1 and -2)	Inhibiteurs de l'activateur du plasminogène; limite la fibrinolyse	Surexpression
TIMP-1 (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1)	Inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice; limite la dégradation de la matrice extracellulaire	Sous-expression de la protéine
TIMP-2 (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1)	Inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice; limite la dégradation de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
MIG-5 (Mitogen inducible gene 5)	Inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice; limite la dégradation de la matrice extracellulaire	Sous-expression de l'ARNm
<i>Protéines lysosomales</i>		
Cathepsine B	Cystéine protéase lysosomale	La forme deux chaînes est surexprimée; la forme une chaîne est sous-exprimée
Terminine	Protéine lysosomale	Clivage de la forme 90 kDa en une forme de 60 kDa
<i>Antioxydants</i>		
Catalase	Dégrade l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Surexpression de la protéine
MnSOD/SOD2	Superoxyde dismutase mitochondriale	Sous-expression, surexpression ou pas de changement de l'ARNm

<i>Chaîne respiratoire mitochondriale</i>		
Cytochrome b	Composant de la chaîne respiratoire ; transporteur d'électrons	Surexpression de l'ARNm
Sous-unité 4 de la NADH déshydrogénase	Composant du complexe I qui accepte les électrons de la NADH et transfère ceux-ci vers l'ubiquinone	Surexpression de l'ARNm
<i>Autres</i>		
Aldéhyde déshydrogénase-1	Rôle dans le métabolisme de l'alcool	Sous-expression de l'ARNm
HSP70, 90	protéines de choc thermique	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Ornithine décarboxylase	Conversion de l'ornithine en putrescine: biosynthèse des polyamines	Sous-expression de la protéine; expression similaire de l'ARNm
LPC-1(Late PDL cDNA-1)	p63; protéine de transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi	L'expression de l'ARNm n'est plus couplée au cycle cellulaire
WS3-10	Protéine liant le $Ca^{++}$	Surexpression de l'ARNm et de la protéine

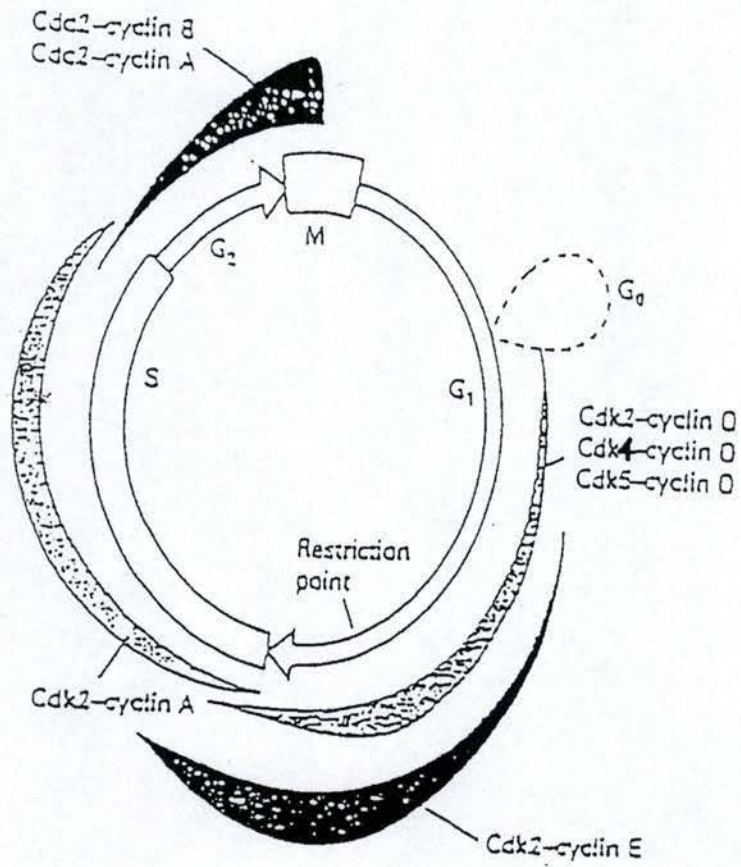
**Tableau I.1:** Gènes ou protéines dont le niveau d'expression ou la régulation post-traductionnelle est modifiée chez les fibroblastes humains lors de la sénescence répliative (Cristofalo *et al.*, 1998).





**Figure I.14:** (a) Autoradiographies de Northern blots réalisés avec de l'ARN total de fibroblastes WI-38 non confluents à différents passages en culture (colonne 1: 25 DCPs; colonne 2: 35 DCPs; colonne 3: 45 DCPs; colonne 4: 49 DCPs) et sur des fibroblastes jeunes ayant subi (colonne 6) ou non (colonne 5) 5 stress d'1h sous 30  $\mu$ M de *t*-BHP. L'ARNr 18S a été utilisé pour normaliser la charge d'ARN.

(b) Quantification des Northern blots réalisés sur des fibroblastes WI-38 non confluents jeunes (colonnes blanches), âgés (colonnes noires) et jeunes ayant subi 5 stress d'1h sous 30  $\mu$ M de *t*-BHP (colonnes hachurées). L'ARNr 18S a été utilisé pour normaliser la charge d'ARN. Le signal obtenu pour les fibroblastes WI-38 jeunes est considéré comme représentant 100% du niveau relatif d'expression (Dumont, P. *et al.*, 2000).

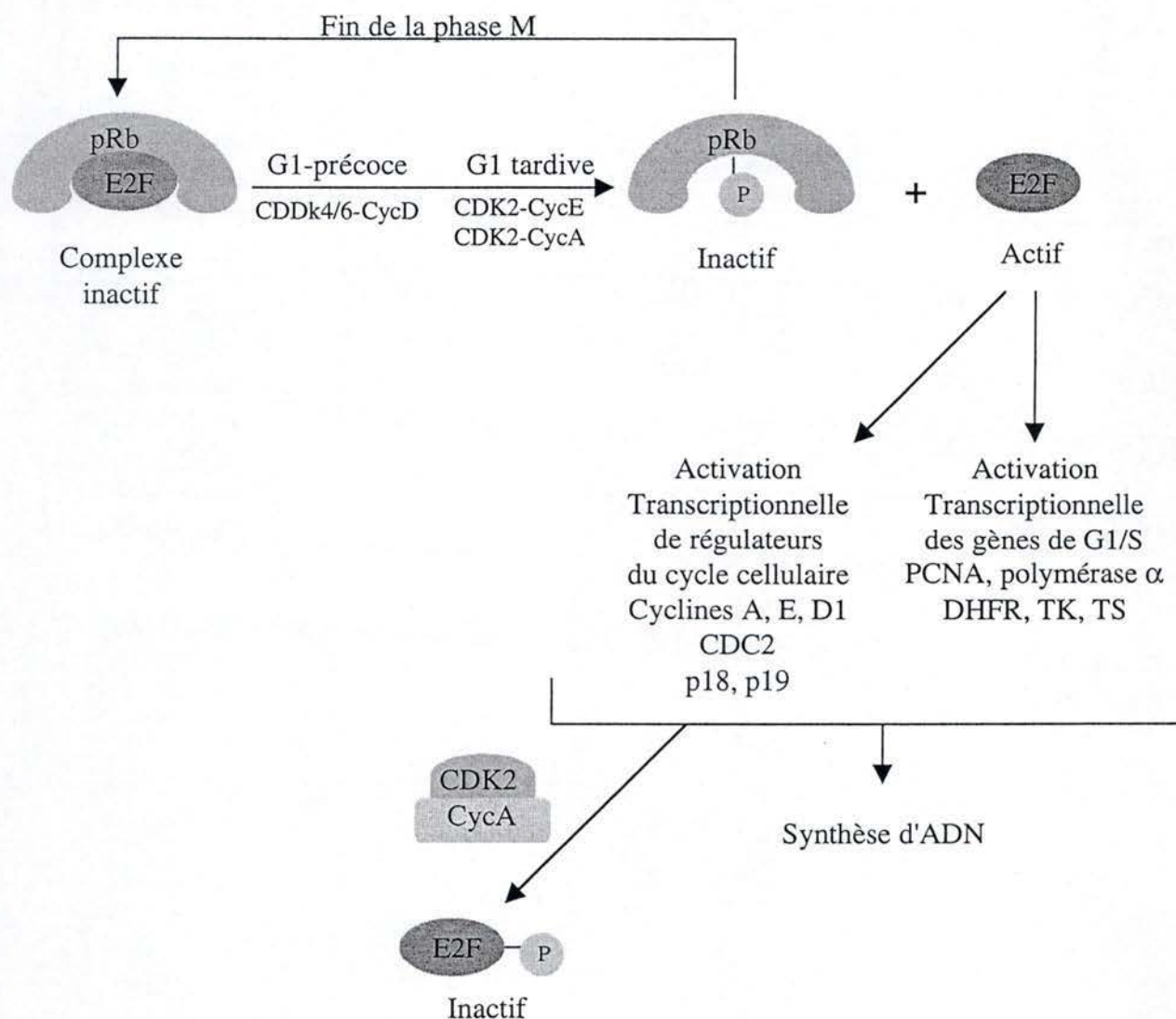


**Figure I.15:** Représentation schématique de l'intervention des différents complexes cycline / KDCs au cours du cycle cellulaire (Lodish, H. *et al.*, 1995).



KDC	Poids moléculaire (kDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
KDC1	34	Cycline B Cycline A	p <sup>21</sup> p <sup>27</sup>	Déclenchement de la mitose
KDC2	33	Cycline A  Cycline E	p <sup>21</sup>  p <sup>27</sup>	Régulation de la réplication de l'ADN (via pRb?) Phosphorylation de pRb
KDC3	36	?		Régulation de la phase G <sub>1</sub>
KDC4	34	Cycline D	p <sup>21</sup> , p <sup>27</sup> , p <sup>15</sup> , p <sup>16</sup>	Phosphorylation de pRb
KDC5	35	Cycline D?	p <sup>21</sup>	Participation au métabolisme
KDC6	40	Cycline D	p <sup>15</sup> , p <sup>16</sup> , p <sup>18</sup>	Phosphorylation de pRb
KDC7	42	Cycline H	?	Activation des autres kinases

**Tableau I.2:** Propriétés des principales KDCs et leurs rôles cellulaires (Wolowiec, D. and French, M., 1996).



**Figure I.16 :** Rôle de pRb dans la régulation du cycle cellulaire (Lodish, H. *et al.*, 1995). La phosphorylation de pRb dès la phase G1 est assurée par différents complexes cyclines-KDC et conduit à la libération du facteur de transcription E2F. Dès lors actif, E2F active la transcription de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans la réplication de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire. E2F active, entre autres, la synthèse de la cycline A. Le complexe KDC2-CycA, actif en phase S, inactive E2F par phosphorylation.



a ) Répression de gènes de réponse précoce aux mitogènes (early response genes) :

Ces gènes sont induits rapidement après une stimulation par des facteurs de croissance. Beaucoup de gènes impliqués en début de phase  $G_1$  sont normalement exprimés chez les cellules sénescents (*c-myc, c-jun, c-rasHa*). Par contre, au moins trois gènes dont l'expression est requise pour débiter la réplication de l'ADN, ne répondent plus aux stimulations mitogéniques chez les cellules âgées. Il s'agit par exemple du proto-oncogène *c-fos* (Seshadri *et al.*, 1990) qui code pour une sous-unité du facteur de transcription AP-1, *c-fos* est essentiel pour l'entrée en phase S et la répression de son expression explique en partie pourquoi les cellules sénescents ne se divisent plus. Le mécanisme responsable de la répression de *c-fos* est connu. Cette répression est due au fait que le Facteur de Réponse au Sérum (FRS) n'est plus capable de se lier sur son site consensus ERS (Elément de Réponse au Sérum) situé dans le promoteur de *c-fos*. Dans les cellules sénescents, FRS est hypophosphorylé et cela empêche sa liaison à ERS, et donc la transcription de *c-fos* (Atadja *et al.*, 1994).

b ) Répression de gènes en phase  $G_1/S$

Plusieurs gènes qui sont normalement induits en fin de phase  $G_1$  ou en transition  $G_1/S$  ne sont plus exprimés dans les cellules sénescents. Par exemple, notons des gènes codant pour des enzymes nécessaires au métabolisme de l'ADN, telles que la thymidine kinase, la thymidilate synthétase, l'ADN polymérase  $\alpha$ , la dihydrofolate réductase.

Le mécanisme responsable de la répression de la plupart des gènes en transition  $G_1/S$  est causé chez les cellules sénescents par une déficience de l'activité du facteur de transcription E2F et, plus particulièrement, dû à la répression de l'expression la sous-unité E2F1 de ce facteur de transcription. L'activité transcriptionnelle de E2F est régulé de façon négative par la forme non phosphorylée de la protéine de rétinoblastome (pRb) (Dimri *et al.*, 1996) ; (Good *et al.*, 1996). La phosphorylation de pRb par des complexes cycline-KDC spécifiques permet la libération d'E2F. Ce dernier peut alors transcrire les gènes nécessaires pour passer en phase S (**Figure I.16**). Dans les cellules sénescents, cette phosphorylation de pRb n'a plus lieu. E2F est constamment inactif.



c ) Répression de cyclines et KDCs

On observe, chez les cellules sénescents, une régulation altérée de l'expression ou de l'activité de divers complexes cycline-KDC (**Figure I.17**). Les cyclines D1 et E (cyclines de la phase G<sub>1</sub>) sont surexprimées chez les cellules âgées même si on les prive de facteurs de croissance ou de sérum. Les KDC4 et KDC6 sont présentes chez les cellules âgées. Les cyclines D s'associent avec les KDC pour former les complexes cyclines D /KDC4 ou 6. Pour ce qui est de KDC2, certaines études disent qu'elle est bien présente chez les cellules âgées mais que les complexes entre KDC2 et les cyclines D1 et E ne se font plus. D'autres études montrent que l'ARNm de KDC2 n'est plus transcrit. A noter aussi, la répression des cyclines A et B, nécessaires en fin de phase G<sub>2</sub> et M. Ces répressions sont dues à un manque d'activité transcriptionnelle de E2F.

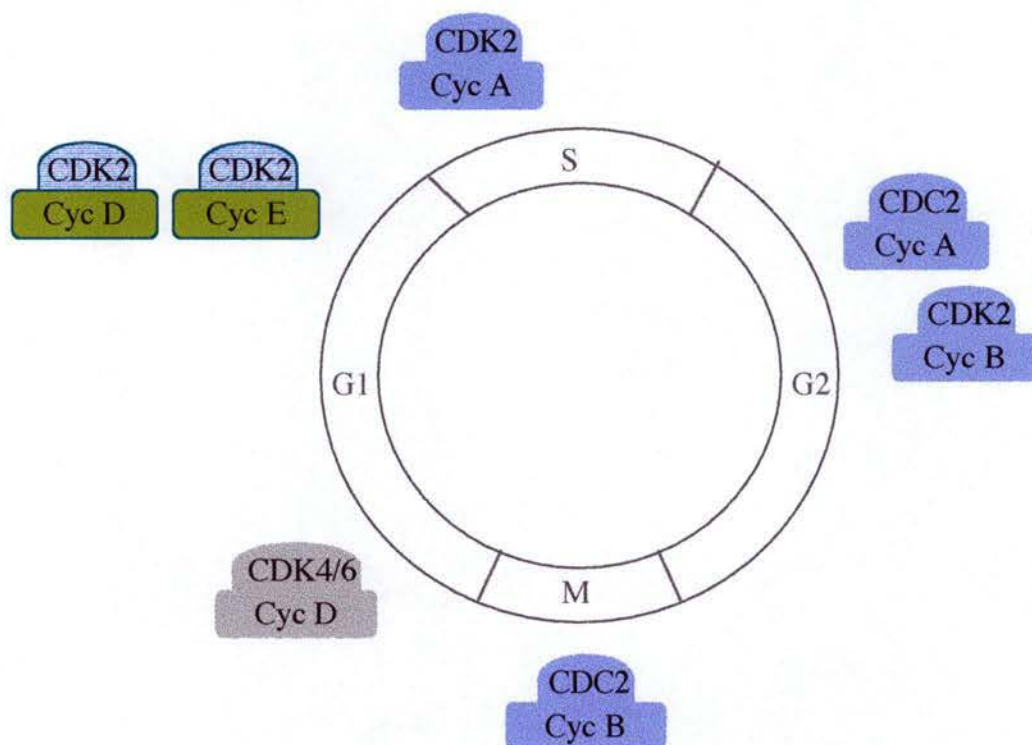
d ) Induction de la synthèse d'inhibiteur de KDC : IKDCs

Il existe des protéines qui s'associent avec les complexes cycline-KDC et qui inhibent leur activité kinasique. Ces protéines inhibitrices de la croissance cellulaire sont classées en 2 familles sur base des homologies de séquence.

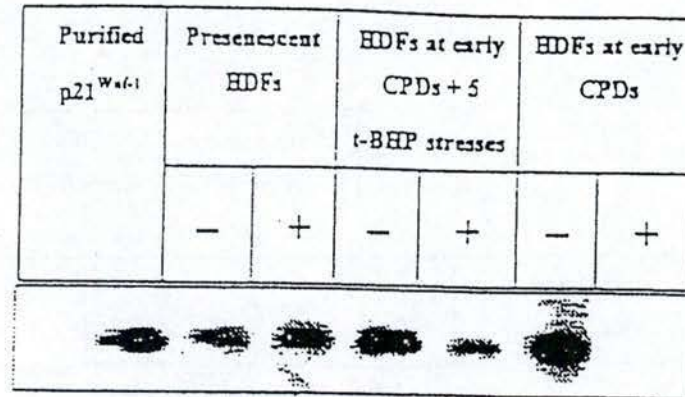
La famille INK4 comprenant p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK5B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup>. Les membres de cette famille se lient tous aux KDC4/6 et exercent leur action inhibitrice de 2 façons différentes. Soit elles empêchent les complexes de se former, soit elles empêchent l'interaction complexe-substrat. La protéine p16<sup>INK4A</sup> notamment, est surexprimée chez les cellules sénescents. Son gène est marqué par des délétions dans beaucoup de cellules tumorales. p16<sup>INK4A</sup> inhibe l'association des cyclines D avec KDC4/6 et empêche la phosphorylation de pRb. Les cellules sont donc bloquées en phase G<sub>1</sub> (Serrano *et al.*, 1997) ; (Hara *et al.*, 1996).

La famille p21<sup>waf-1</sup>. Cette famille comprend aussi p27<sup>kip-1</sup> et p57<sup>kip-2</sup>. p21<sup>waf-1</sup> est induite par p53. p21<sup>waf-1</sup> interagit avec les KDCs et empêche l'activité kinasique de nombreux complexes de la phase G<sub>1</sub>, tels que cycline D et E / KDC 2 et 4. p53 est un suppresseur de tumeurs qui, dans 50% des tumeurs, est muté, ne jouant alors plus son activité de suppresseur de tumeurs. Normalement, p53 est présent dans la cellule en faible quantité. Ceci est dû à la présence de MDM2, dont l'expression est induite par les mitogènes. MDM2 est capable de se fixer à p53 et de faciliter sa dégradation. Dans les cellules sénescents, MDM2 n'est plus induit, ce qui a pour conséquence l'activation de p53. p53 se fixe à sa séquence consensus



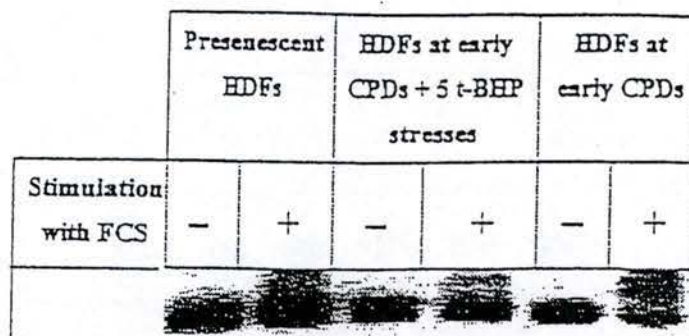


**Figure I.17 :** Représentation simplifiée des différents complexes cycline-KDC qui sont affectés chez les cellules sénescents, soit par modification de l'expression d'un des constituants du complexe soit par inhibition de l'activité du complexe (Afshari *et al.*, 1996). Encadré bleu : inactifs chez les cellules sénescents, vert : surexprimés chez les cellules sénescents, bleu : sous-exprimés chez les cellules sénescents, gris : exprimés et actifs chez les cellules sénescents.



**Figure I.18:** Analyse de l'expression de p21<sup>waf-1</sup> par Western blot. Les extraits protéiques proviennent de fibroblastes WI-38 jeunes, âgés et jeunes ayant subi 5 stress sous 30  $\mu$ M de *t*-BHP et ayant récupéré pendant 48h. Ensuite, les fibroblastes ont été incubés pendant 48h dans du milieu sans facteur de croissance (BME+ 0,5% HLA). Après 21h de stimulation au BME+ 10% FCS («Foetal Calf Serum» contenant des facteurs de croissance), les protéines ont été extraites des cellules pour réaliser le Western blot. Les résultats montrés sont ceux obtenus pour les extraits de fibroblastes WI-38 après 48h de privation de facteurs de croissance (-, non stimulées avec du BME+ 10% FCS) et après la stimulation ultérieure avec 10% FCS pendant 21h (+) (Dumont, P. *et al.*, 2000).





**Figure I.19:** Analyse de la phosphorylation de pRb par Western blot. Les extraits protéiques proviennent de fibroblastes WI-38 jeunes, âgés, jeunes ayant subi 5 stress sous 30  $\mu$ M de *t*-BHP et ayant récupéré pendant 48h. Ensuite, les fibroblastes ont été incubés pendant 48h dans du milieu sans facteur de croissance (BME+ 0,5% H-L-A). Après 21h de stimulation au BME+ 10% FCS, les protéines ont été extraites des cellules pour réaliser le Western blot. Les résultats montrés sont ceux obtenus pour les extraits de fibroblastes WI-38 après 48h de privation de facteurs de croissance (-, non stimulées avec du BME+ 10% FCS) et après stimulation ultérieure avec 10% FCS pendant 21h (+) (Dumont, P. *et al.*, 2000).

dans le promoteur de  $p21^{waf-1}$  et déclenche sa transcription (Stein *et al.*, 1990) ; (Noda *et al.*, 1994).

Pour les fibroblastes humains en SIPS, des analyses par Western blot ont montré qu'il y avait une surexpression de  $p21^{waf-1}$ , comme dans les cellules âgées, et que le niveau de phosphorylation de pRb est bas dans les deux situations (**Figures I.18 et 19**). Le niveau d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de cellules en SIPS déclenchée par le *t*-BHP a été analysé. Les résultats montrent une diminution nette de l'incorporation chez les cellules en SIPS, comparable à celle observée chez des cellules se situant à 95% de leur durée de vie proliférative (Dumont *et al.*, 2000) (**Figure I.20**).

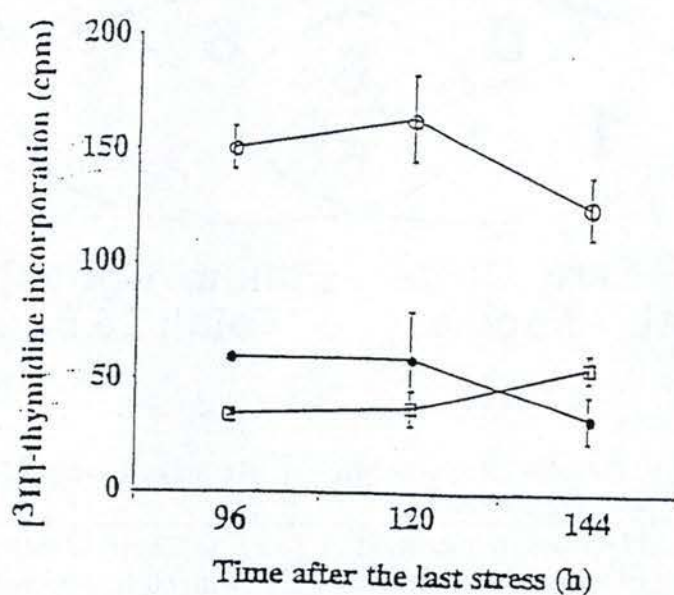
### **I.5 Est-ce que la SIPS et la SR sont deux processus similaires ?**

Au-delà des ressemblances entre les fibroblastes en Sénescence Induite Prématûrement par les Stress (SIPS) et les fibroblastes en Sénescence Réplicative (SR), notre équipe a voulu comparer plus globalement le niveau d'expression génique dans ces deux phénotypes. Ce travail a été réalisé au niveau protéique par analyse du protéome (Dierick *et al.*, in press) et au niveau ARN messager par analyse du transcriptome.

L'analyse transcriptomique a tout d'abord été étudiée par « RT-PCR Differential Display » (DD RT-PCR). Cette technique génère, par PCR, des fragments de tailles variées à partir des ADN complémentaires synthétisés par transcription inverse de l'ARN issu des cellules d'intérêt. La comparaison des profils d'électrophorèse obtenus à partir de ces produits PCR donne un accès à l'expression différentielle des transcrits entre les populations étudiées. Les amplicons d'intérêt sont séquencés et identifiés. Cependant, un désavantage de cette technique est qu'elle génère de nombreux faux-positifs. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques alternatives pour confirmer toute expression différentielle mise en évidence par « DD RT-PCR ». Notre laboratoire ayant accès à la technologie des damiers à ADN et à celle de la PCR en temps réel, ces deux approches ont été utilisées pour vérifier et valider les résultats obtenus par « DD RT-PCR ». Nous allons, dans la suite de cette introduction, décrire brièvement ces deux types d'approches.

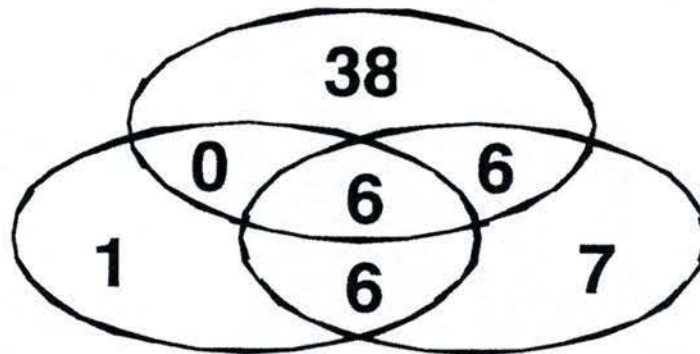
L'analyse protéomique, quant à elle, est une analyse de l'ensemble des protéines exprimées dans un système biologique donné dans des conditions données (Wilkins *et al.*, 1996). Elle permet d'étudier le profil d'expression de nombreuses protéines à la fois ainsi que leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, etc.).





**Figure I.20:** Effets à long terme de stress subcytotoxiques répétés au t-BHP sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes WI-38. 96, 120 et 144h après le dernier stress, les cellules ont été incubées avec 1 $\mu$ Ci de thymidine tritiée pendant 3h et le niveau de radioactivité a été mesuré. Fibroblastes ayant épuisé moins de 65% de leur potentiel de prolifération au moment des stress (rond noir). Fibroblastes ayant épuisé moins de 65% de leur potentiel de prolifération mais n'ayant subi aucun stress (rond blanc). Fibroblastes à 95% de leur potentiel de prolifération (carré blanc). Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) et représentent les valeurs moyennes  $\pm$  les déviations standard obtenues à partir de 4 expériences. (Dumont, P. *et al.*, 2000).

**Senescent/Early CPDs**  
Total: 50 spots



**t-BHP/Early CPDs**  
Total: 13 spots

**Ethanol/Early CPDs**  
Total: 25 spots

Phenotype	Number of spots with changed I.I	Range of change of I.I.
RS	34 spots with increased I.I +16 spots with decreased I.I =50	0.3- to 22.7-fold increase 0.3- to 9.0-fold decrease
t-BHP-induced SIPS	11 spots with increased I.I + 2 spots with decreased I.I =13	0.5- to 0.7-fold increase 0.3- and 0.6-fold decrease
ethanol-induced SIPS	18 spots with increased I.I + 7 spots with decreased I.I =25	0.3- to 0.6-fold increase 0.3- to 0.7-fold decrease

**Figure I.21** : Représentation globale du nombre de différences d'intensité normalisée trouvées parmi les 1819 spots répertoriés sur les gels d'électrophorèse bidimensionnels obtenus à partir d'échantillons protéiques produits dans les conditions suivantes: FHDs sénescents (comparés aux FHDs jeunes), les FHDs traités au t-BHP (comparés aux FHDs jeunes et aux FHDs contrôles) et les FHDs traités à l'éthanol (comparés aux FHDs jeunes et aux FHDs contrôles).



L'équipe de Bayreuther fut la première à avoir étudié les effets à long terme des stress sur des FHDs en observant les profils d'expression de protéines par gel 2D pour des clones de FHDs morphologiquement différents. Ils trouvèrent des spots qui étaient spécifiques des différents morphotypes et observèrent une accélération de la transition d'un morphotype à l'autre quand les fibroblastes étaient soumis à des stress répétés (Bayreuther *et al.*, 1988). De plus, certains changements d'expression de protéines semblaient être similaires dans les fibroblastes sénescents ou bien soumis à des stress (Rodemann, 1989; Rodemann *et al.*, 1989a; Rodemann *et al.*, 1989b).

Une étude similaire a été réalisée au laboratoire afin de pouvoir comparer au niveau protéomique, les fibroblastes en SIPS et en sénescence répllicative et vérifier si ces deux processus sont similaires (Dierick *et al.*, soumis). Le niveau d'expression de 1819 espèces protéiques extraites à partir de fibroblastes WI-38 en SIPS induite par l'éthanol ou le *t*-BHP et en SR a été comparé à celui de fibroblastes WI-38 jeunes. Pour pouvoir étudier les effets à long terme des stress, les protéines synthétisées par les différentes populations expérimentales furent marquées radioactivement durant 20 h à la  $^{35}\text{S}$ - méthionine en commençant 50 heures après le dernier stress. Parmi tous les spots analysés, 50 montrent une différence d'intensité significative entre les fibroblastes jeunes et âgés dont 38 sont spécifiques à la sénescence répllicative tandis que les 12 autres présentent également des variations dans les cellules en SIPS due à l'éthanol ou au *t*-BHP. Seulement 6 spots sont communs à la sénescence répllicative et aux deux types de stress. Les autres changements observés étaient soit spécifiques à la sénescence ou à un type de stress ou communs aux deux situations. Ces résultats ont prouvé qu'au-delà des ressemblances partagées par la SIPS et la SR, ces deux phénomènes sont bien des processus distincts (**Figure I.21**). Cette technique a permis l'identification de 30 protéines subissant des changements d'expression dans la SIPS et/ou dans la SR (**Tableau I.3**) (Dierick *et al.*, soumis). Parmi ces protéines, quatre ont été choisies. Le niveau d'expression de leur ARN messager a été analysé par PCR en temps réel. Ces protéines sont l'isoforme  $M_2$  de la pyruvate kinase ( $\text{PKM}_2$ ) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), enzymes clés de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates respectivement ; ainsi que l'AOP2, enzyme antioxydante et l'HSP27, protéine chaperone. Ces différentes protéines seront décrites dans la partie résultats et discussion.

Spot #	Identification	DB #	MW	pI	ratio Sen	ratio t-BHP	ratio EtOH
N 101	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6	147 ± 27	174 ± 35	136 ± 24
I 818	Peroxiredoxin VI	P30041	25	6.3	48 ± 13	144 ± 30	156 ± 39
I 709	14-3-3 protein tau	P27348	28	4.7		new spot	new spot
I 1086	14-3-3 protein tau	P27348	28	4.7		new spot	new spot
I 667	actin isoform (between 30 and 35 kDa)	P53493	42	5.3		168 ± 54	249 ± 61
I 684	HSP27	P04792	24	7.8	130 ± 13		
I 660	chloride intracellular channel protein 1	O00299	27	4.9	146 ± 17		
N 472	electron transfert flavoprotein beta-subunit	P38117	28	8.2	152 ± 23		
I 734	BAG-family molecular chaperone regulator	O95816	24	6.2	159 ± 18		
N 389	alpha-actinin isoform (around 20 kDa)	P12814	103	5.2	171 ± 69		
I 727	Peroxiredoxin VI	P30041	25	6.3	178 ± 30		
N 628	lamin C	P02546	65	6.8	193 ± 30		
I 539	alcohol dehydrogenase	P14550	36	6.3	200 ± 50		
I 815	creatin kinase BC	P12277	43	5.4	204 ± 59		
I 500	creatin kinase BC	P12277	43	5.4	207 ± 21		
N 208	alpha-enolase	P06733	47	7.4	198 ± 59		
N 587	alpha-enolase	P06733	47	7.4	550 ± 145		
I 626	annexin I	P04083	39	6.6	50 ± 15		
N 623	calmodulin binding protein	O88482	67	11.3	56 ± 11		
I 256	lamin C	P02546	65	6.8	58 ± 17		
N 464	NADH-cytochrome B5 reductase	P00387	34	7.6	60 ± 25		
I 412	actin	P53493	42	5.3	64 ± 4		
I 342	glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase	P11413	59	6.4	65 ± 14		
I 717	Peroxiredoxin VI	P30041	25	6.3			151 ± 29
N 102	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6			150 ± 21
I 610	esterase D	P10768	31	7.0			144 ± 26
I 689	guanidinoacetate N methyltransferase	Q14353	26	5.7			130 ± 14
I 1025	HSP90	P08238	83	4.8			58 ± 27
I 913	HSP90	P08238	83	4.8			66 ± 15
I 46	glucosidase II precursor	Q14679	107	6.0		171 ± 34	

**Tableau I.3:** Liste des 30 protéines identifiées par analyse protéomique via les gels bidimensionnels



## **I.6 La PCR en temps réel (Pour une revue : (Salmon, 2002))**

### **I.6.1 Introduction**

La PCR en temps réel permet de mesurer par fluorescence l'accumulation des produits d'amplification au cours de la réaction. Cette technique est bien adaptée pour l'étude de l'expression différentielle de gènes.

Dans notre cas, la PCR en temps réel a été utilisée afin de valider les résultats obtenus par DD RT-PCR et par damier à ADN et pour lesquels on veut comparer le niveau d'expression lors de la SIPS et de la SR.

### **I.6.2 Principe**

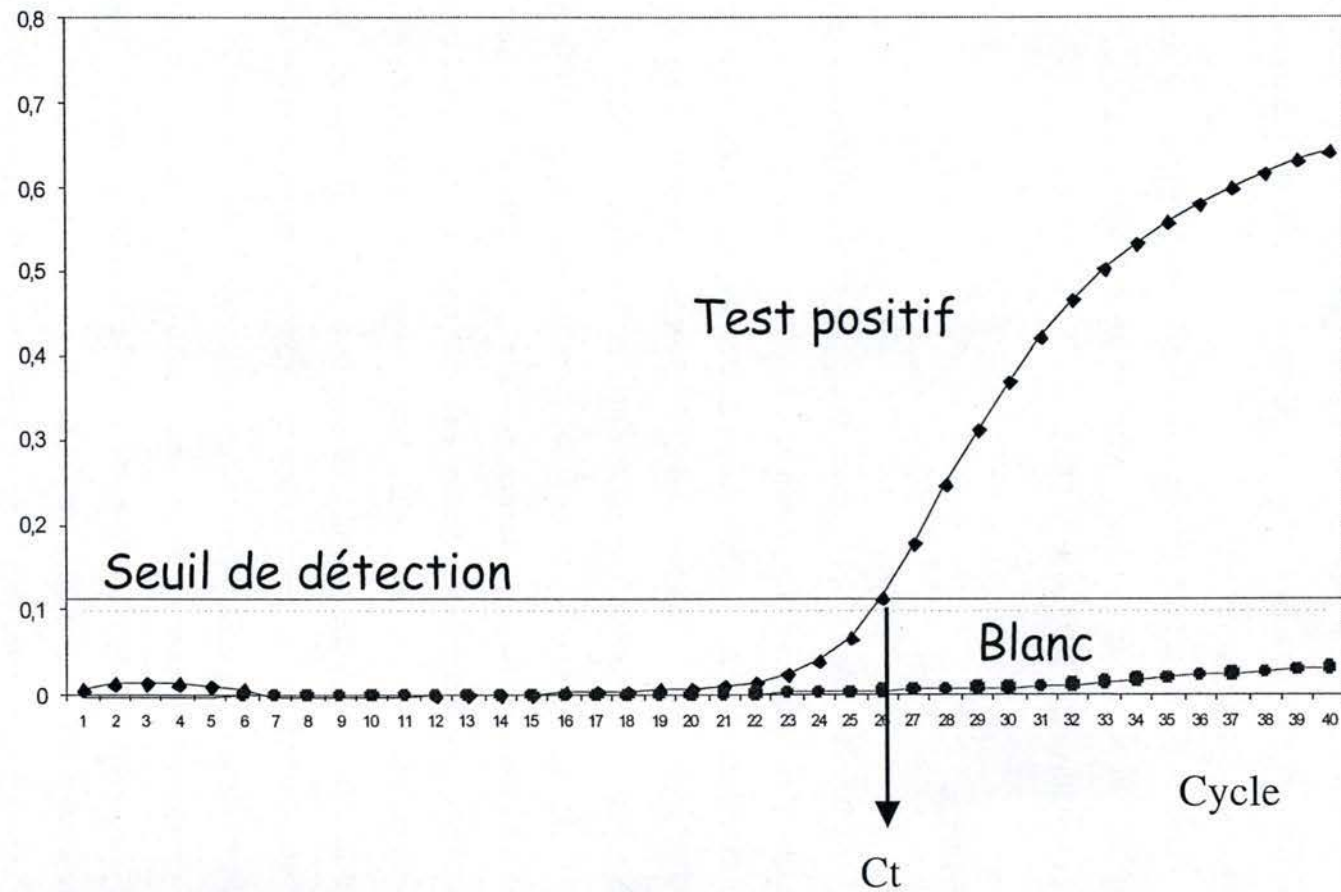
Avant toute chose, il faut générer des amorces spécifiques des gènes d'intérêt. Celles-ci sont choisies dans des exons distincts afin de contrôler que les amplicons générés par la PCR proviennent bien de l'amplification de l'ADNc et pas d'une éventuelle contamination par l'ADN génomique. L'ARNm issu des différents échantillons est d'abord rétrotranscrit. L'ADNc ainsi généré va servir de matrice pour la PCR en temps réel.

Ce système permet de lier de façon proportionnelle la quantité de molécules de départ (matrice) à l'intensité de fluorescence mesurée cycle après cycle, directement dans le tube PCR. Différentes méthodes de détection existent : comme les sondes d'hydrolyse, les amorces fluorescentes, etc. Dans notre travail, nous avons utilisé une molécule appelée Sybr Green. Il s'agit d'un agent intercalant capable d'émettre un signal fluorescent, une fois lié à l'ADN double brin. Le Sybr Green permet donc de détecter l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque étape d'extension de la PCR, et ce cycle par cycle.

Cependant, l'utilisation de cette molécule, qui se lie de façon non spécifique à l'ADN double brin, nécessite de vérifier que seul l'amplicon désiré est produit au cours de la PCR, de manière à pouvoir être semi-quantitatif. Cette vérification se fait de deux manières :

D'une part, par électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR. D'autre part, par la réalisation d'une courbe de dissociation des amplicons lors d'un gradient de température de 60 à 95°C. La dénaturation permet la libération du Sybr Green en solution, ce qui a pour effet de diminuer très fortement la fluorescence. En portant sur un graphique la dérivée de cette courbe de fluorescence en fonction de la température, on obtient un pic correspondant à la

Fluorescence



**Figure I.23 :** Courbe d'amplification obtenue par PCR en temps réel, montrant la fluorescence émise par le SyBr Green en fonction des cycles PCR



libération du SyBr Green. Or la température de melting de l'amplicon dépend directement de sa taille et de sa composition en nucléotides. Il est donc aisé de vérifier si le produit amplifié est bien celui attendu et s'il est unique (présence d'un seul pic).

La courbe d'amplification obtenue par Real-Time PCR, et reprise à la **Figure I.23**, montre l'évolution de la fluorescence au fur et à mesure des cycles. Durant les premiers cycles, la fluorescence détectée correspond au bruit de fond. Le seuil de détection correspond à une intensité de fluorescence significativement différente du niveau de basal. Le cycle où le signal de fluorescence franchit ce seuil s'appelle le Ct (cycle seuil ou threshold cycle). Ce point critique est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc de départ. Autrement dit, plus il y a d'ADNc dans l'échantillon de départ, moins de cycles il faudra pour atteindre ce seuil de détection et inversement. Pour obtenir des résultats semi-quantitatifs, le Ct doit toujours se trouver dans la phase exponentielle d'amplification.

Afin de pouvoir comparer le niveau d'expression d'un gène dans différentes situations, l'établissement d'une courbe standard est requise (Bustin, 2000).

La PCR en temps réel présente de nombreux avantages : elle est entièrement automatisable, ce qui permet des analyses à un débit élevé, et surtout, elle ne nécessite pas de manipulation après amplification comme par exemple, l'ouverture des tubes PCR pour les mettre sur gel, ce qui évite les problèmes de contamination.

## **I.7 But du mémoire**

L'exposition de fibroblastes humains à divers types de stress comme le *t*-BHP ou l'éthanol à doses subcytotoxiques, induit l'apparition d'une sénescence induite prématurément par les stress, abrégée sous l'acronyme "SIPS".

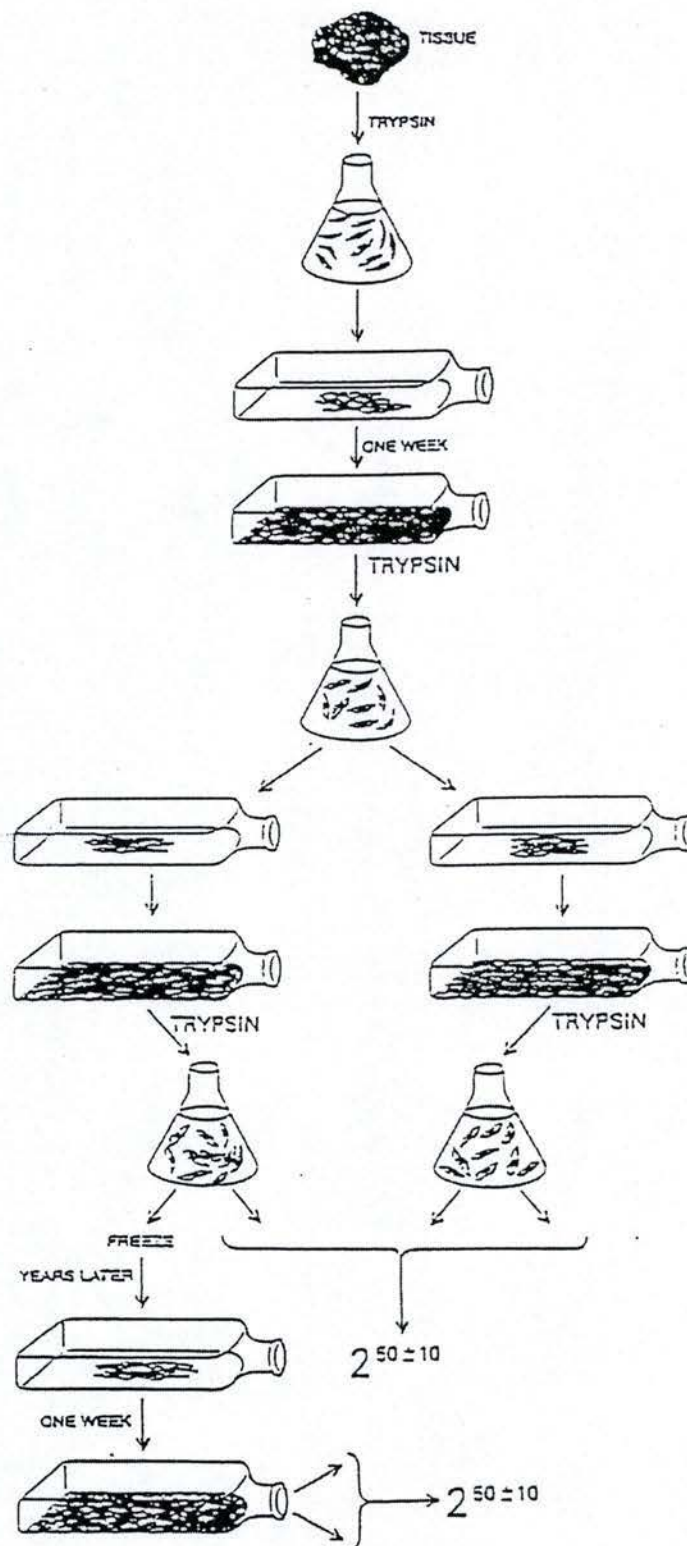
Dans ce travail, nous allons tout d'abord vérifier par RT-PCR en temps réel les résultats obtenus par "differential display", à savoir l'expression différentielle de huit gènes en sénescence répliquative et en SIPS.

Ensuite, nous testerons si les différences de niveaux protéiques mises en évidence en sénescence répliquative et en SIPS par une étude protéomique se retrouvent aussi au niveau des quantités relatives des transcrits correspondant à ces protéines.

Enfin, pour certains candidats susceptibles de jouer un rôle dans la résistance cellulaire au stress, nous allons construire les vecteurs d'expression permettant une transfection de leur ADNc et leur surexpression dans des fibroblastes humains, avant de les exposer à des doses cytotoxiques de *t*-BHP et d'éthanol. Ce travail ouvrira la porte vers des études ultérieures où les effets de transfusions stables de ces ADNc seront testés sur l'apparition des principaux biomarqueurs de la SIPS.



**Matériel**  
**et**  
**Méthodes**



**Figure II.1** : Schéma représentant le principe de culture cellulaire sériée (Hayflick, L. et Moorhead, P.S., 1961)



## **II MATERIEL ET METHODES**

### **II.1 Techniques de culture cellulaire**

Dans la cadre de cette étude, nous avons utilisé des fibroblastes pulmonaires fœtaux d'origine humaine WI-38 (Hayflick and Moorhead, 1961), ainsi que ces mêmes cellules immortalisées par l'antigène T du virus SV40 (SV40). Ces cellules proviennent de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.).

#### **Matériel :**

- BME : Milieu basal de Eagle (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- BME + 10% FBS : Milieu BME additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Milieu de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline, 10mM, NaCl 0.9%, pH 7.4)
- Solution de trypsine : Trypsine à 0.25% (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm<sup>2</sup> (T25) ou de 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Corning, Cambridge, U.S.A.)
- Fibroblastes SV40 ou WI-38 à confluence.
- MEM (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Antibiotiques (Pénicilline-Streptavidine (Bio-Whitaker, Verviers, Belgique).

#### **Méthode :**

##### **II.1.1 Repiquage des fibroblastes WI-38 et SV40**

Les cellules sont maintenues en culture selon la méthode décrite par Hayflick (**Figure II.1**) (Hayflick *et al.*, 1961). Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75). Quand elles sont confluentes, c'est-à-dire quand elles ont atteint la densité moyenne de 40.000 cellules par cm<sup>2</sup>, elles sont repiquées dans des conditions stériles.

- Préchauffer le milieu de rinçage (PBS), le milieu de culture (BME + 10% FBS pour les WI-38 ou MEM + 10% FBS pour les SV40) et la trypsine à 37°C.
- Décanter l'ancien milieu et rincer les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage afin d'éliminer toute trace de sérum. En effet, celui-ci contient des protéases qui pourraient inhiber l'action de la trypsine.
- Ajouter 2 ml de trypsine par T75 et, lorsque l'on observe un arrondissement des cellules au microscope à contraste de phase, enlever l'excédent de trypsine. Incuber les cellules à 37°C jusqu'à ce qu'elles soient toutes détachées, c'est-à-dire pendant environ 1 minute pour les SV-40 et environ 10 min pour les WI-38.
- Rajouter 10 ml de BME +10% FBS dans la T75 pour les WI-38 et 10 ml de MEM + 10% FBS pour les SV40, et à l'aide d'une pipette Pasteur, rompre les agrégats cellulaires.
- Homogénéiser et répartir le milieu contenant les cellules détachées en 2 ou 4 T75. Après cela, ajouter dans chacune des boîtes de culture du BME +10% FBS ou du MEM + 10% FBS pour porter à un volume de 15 ml par T75.
- Placer les boîtes de culture contenant les WI-38 entrouvertes dans une étuve à 37°C diffusant de l'air contenant 5% de CO<sub>2</sub> afin d'ajuster le pH du milieu de culture et placer les boîtes de culture contenant les SV40 dans l'étuve à 37°C sans CO<sub>2</sub>.

### II.1.2 Cryoconservation des cellules

Afin de pouvoir conserver les cellules à un stade donné de leur développement ou les conserver à long terme, celles-ci sont congelées dans de l'azote liquide.

- Rincer et traiter les cellules à la trypsine comme cela a été décrit ci-dessus pour le repiquage.
- Ajouter 9 ml de BME + 10% FBS et répartir dans deux tubes de 10 ml.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 1000 rpm (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne).



- Décanter le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 ml de milieu de congélation (BME + 10% DMSO + 20% FBS. Placer le tout dans un cryotube. (Corning, Cambridge, U.S.A.).

- La congélation se déroule en deux étapes:

La température descend tout d'abord progressivement jusqu'à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pour ce faire, le cryotube est placé dans deux tubes, un de 10 ml (Becton Dickinson, Cowley, Grande-Bretagne) et un de 50 ml (Sarstedt, Numbrecht, Allemagne), fermés hermétiquement et plongés dans une bouteille d'éthanol absolu à température ambiante. Celle-ci est alors placée à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Après un minimum de 12 heures, le cryotube est plongé dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **II.1.3 Décongélation et mise en culture des cellules**

Le cryotube contenant les cellules à décongeler est immédiatement placé dans un berlin contenant de l'eau à  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Centrifuger les cellules pendant 10 minutes à 1000 rpm.
- Resuspendre le culot dans du BME + 10% FBS et transférer dans une nouvelle boîte de culture.
- Le lendemain, changer le milieu de culture afin d'éliminer toute trace de DMSO.

## **II.2 Stress subcytotoxiques sur les fibroblastes WI-38 et apparition des biomarqueurs associés à la sénescence.**

Afin de pouvoir étudier l'effet des stress sur les cellules WI-38, nous avons effectué des stress successifs pendant 5 jours à raison d'un stress par jour au *tert*-butylhydroperoxyde et à l'éthanol.

### II.2.1 Description des stress

Stress au *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) : le *t*-BHP est une molécule organique amphiphile pouvant pénétrer facilement à travers la membrane biologique. Une fois dans le cytoplasme, il réagit avec des métaux de transition et génère de ce fait des radicaux hydroxyles. Ceux-ci sont capables d'initier la peroxydation lipidique, permettant ainsi une augmentation de la perméabilité membranaire, un influx de calcium mais aussi des altérations chromosomiques, une inhibition de la synthèse d'ADN et donc, un arrêt de la division cellulaire.

Stress à l'éthanol (EtOH) : c'est un alcool à courte chaîne carbonée pouvant s'infiltrer dans la double couche lipidique des cellules, les rendant ainsi, encore plus fluides. En tant que solvant organique, il déstabilise les membranes, perturbe l'organisation des phospholipides et acides gras composant la membrane plasmique.

#### Matériel :

- BME + 10% FBS : Milieu BME additionné de 10% de sérum de veau fœtal
- (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- PBS : Phosphate Buffer Saline 10mM, NaCl 0.9%, pH 7.4)
- *tert*-butylhydroperoxyde (Merck, Darmstadt, Allemagne) : stock à 7.92 M
- Ethanol absolu filtré (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Boîtes de culture stériles (T75 et T25)
- H<sub>2</sub>O filtrée à l'aide d'une seringue + filtre.

#### Méthode :

- Repiquer les cellules dans des T25 (contrôles S.A  $\beta$ -gal et incorporation de thymidine tritiée) et dans des T75 en présence de BME + 10% FBS.
- Lorsqu'elles arrivent à confluence, les soumettre à une série de cinq stress successifs au *t*-BHP et à l'EtOH, à raison d'un stress par jour.
- Une première série de fibroblastes WI-38 est soumise à un stress au *t*-BHP à 30 $\mu$ M, dilué dans du BME+ 10% FBS et ce, pendant 1h.



- Une autre série est soumise à un stress à l'éthanol 5% pendant 2h. Comme pour le *t*-BHP, l'éthanol est dilué dans du BME+ 10% FBS.
- Rincer les cellules au PBS (10ml).
- Décanter le PBS, puis rajouter 15 ml de milieu de culture BME+ 10% FBS aux cellules.

Une série de contrôles est réalisée. Dans ce cas, les mêmes étapes que pour les cellules stressées sont effectuées mais on ne leur rajoute pas de molécules stressantes dans leur milieu de culture.

Après les cinq jours de stress successifs, laisser une période de récupération de 3 jours aux cellules, ceci afin de pouvoir discriminer la réponse au stress à court terme de celle à long terme. Renouveler le milieu de culture des cellules la veille de l'extraction d'ARN.

### **II.3 Etude de l'activité $\beta$ - galactosidase associée à la sénescence**

#### **Matériel :**

- tampon PBS : (Phosphate Buffer Saline) : tampon phosphate 10 mM à pH 7.4 contenant 0.9% de NaCl
- Solution de fixation :
  - Formaldéhyde 2% (Belgolabo, Overijse, Belgique)
  - Glutaraldéhyde 0.2% (Fluka, Buchs, Suisse)
- Solution de coloration:
  - Tampon phosphate à pH 6 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Ferrocyanure de potassium 0.1 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Ferricyanure de potassium 0.1 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Chlorure de sodium (NaCl) 5 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) 1 M
  - 1 mg/ml de 5- bromo-4- chloro-3- indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal) (Eurogentec, Seraing, Belgique). La solution stock se trouve à 20 mg/ml dilué dans du N, N'- diméthylformamide (Janssen Chimica, Belgique) conservée à  $-20^{\circ}C$
- Méthanol (Acros organics, Geel, Belgique)
- Plaque 6 puits stériles

Méthode :

Le lendemain du dernier stress (et le jour du premier stress pour les cellules non stressées (j0), repiquer les cellules à faible densité (10.000 cellules/puits).

- Décanter le milieu de culture et rincer les cellules deux fois au PBS (2 ml).
- Fixer les cellules dans 2 ml de solution de fixation pendant 5 minutes.
- Rincer à nouveau les cellules deux fois avec du PBS.
- Ajouter 2 ml de solution de coloration afin de détecter l'activité S.A  $\beta$ -gal.
- Incuber de 12 à 17 heures à 37°C dans l'étuve sans CO<sub>2</sub> pour obtenir une coloration optimale.
- Laver les cellules deux fois au PBS.
- Rincer, deux fois au méthanol.
- Laisser sécher à température ambiante.

Par après, compter la proportion de cellules présentant une activité S.A  $\beta$ -gal par rapport aux cellules non colorées grâce au microscope optique. La coloration se concentre dans la région périnucléaire et est plus ou moins diffuse dans le cytosol.

#### **II.4 Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée**

Matériel :

- plaques multi-puits
- thymidine tritiée
- acide trichloroacétique 10% préalablement refroidi sur glace
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4)
- Ethanol 70%
- NaOH (0.5 M)
- HCl (0.5 M)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)



- Compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, U.S.A.)

#### Méthode :

- Repiquer les cellules en plaque multi-puits à raison de 10.000 cellules par puits.
- Ajouter un volume de thymidine tritiée (1  $\mu$ Ci) au milieu de culture.
- Après 24 heures d'incorporation, décanter le milieu de culture contenant la thymidine tritiée. - Rincer les puits au PBS, à l'acide trichloroacétique 10% préalablement refroidi sur glace, à l'éthanol 70%, et une nouvelle fois au PBS.
- Ajouter du NaOH 5 M dans chacun des puits afin de dissoudre les précipités formés.
- Neutraliser l'action du NaOH en ajoutant un volume égal d'HCl 5 M.
- Homogénéiser et reprendre toute la solution à laquelle une solution d'Aqualuma est ajoutée. Cette substance permet de visualiser l'incorporation de thymidine tritiée au compteur à scintillations par une réaction qui transforme l'énergie radioactive contenue dans la solution en énergie lumineuse (photons).

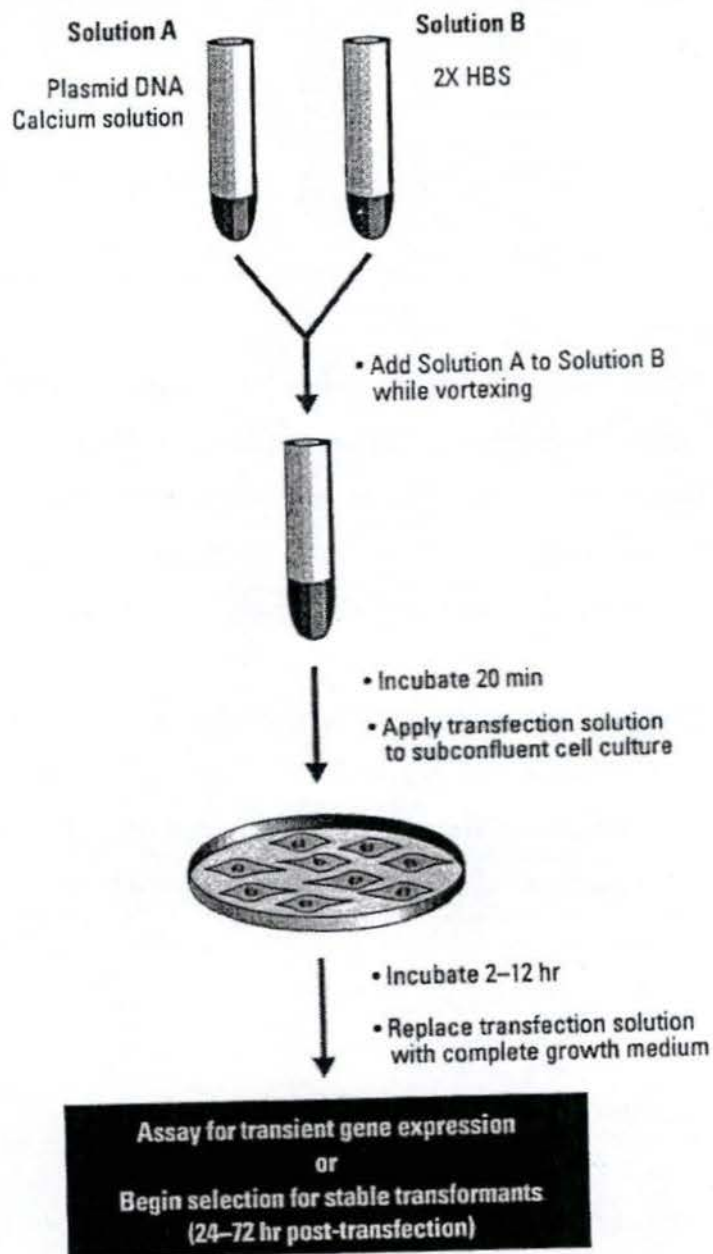
## **II.5 Transfection des fibroblastes SV 40**

Ces cellules ont été transfectées avec les vecteurs d'expression contenant les ADNc codant pour les protéines d'intérêt. La méthode de transfection au phosphate de calcium a été utilisée dans le cadre de ce travail.

#### Matériel :

Utilisation du kit (Calphos Mammalian transfection kit, Clontech, Palo Alto, U.S.A.) contenant :

- HBS (Hepes-Buffer saline 2X) (Clontech, Palo Alto, U.S.A.) stocké à - 20°C
- Solution de calcium 2 M (Clontech, Palo Alto, U.S.A.)
- Cellules à 50-80% de confluence



**Figure II.2 :** Méthode de transfection au phosphate de calcium



- Milieu de culture (MEM) + Antibiotique + 10% FBS
- PBS (Phosphate Buffer Saline) 10 mM à pH 7.4 contenant 0.9% de NaCl
- ADN plasmidique purifié
- eau stérile

Méthode :

- Repiquer les cellules à transfecter la veille de manière à obtenir entre 50 et 80% de confluence.
- Trois heures avant la transfection, changer le milieu de culture des cellules.
- Pour chaque transfection, préparer les solutions A et B : (**Figure II.2**)
- Solution A (900  $\mu$ l) : ADN plasmidique (30  $\mu$ g)
  - eau stérile
  - solution de calcium 2 M
- Solution B (900  $\mu$ l) : HBS 2X
- Ajouter la solution A goutte-à-goutte à l'aide d'une pipette Pasteur à la solution B tout en bullant la solution B. On permet ainsi la formation d'un précipité de phosphate de calcium et d'ADN.
- Incuber la solution de transfection pendant 20 minutes à température ambiante.
- Vortexer doucement la solution avant de l'ajouter goutte à goutte au milieu de culture.
- Incuber les cellules de 2 à 12 heures dans une étuve à 5% CO<sub>2</sub> (37°C).
- Retirer le milieu de culture et rincer une fois au PBS.
- Rajouter 12 ml de MEM + 10% FBS.
- Incuber dans l'étuve à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. La sélection au G418 des cellules transfectées débute 24 à 72 heures après la transfection.

## **II.6 Sélection au G418 (généticine)**

### Matériel :

- G418 ou généticine : stock en poudre (70%) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- MEM + antibiotiques+ 10% FBS
- filtre 0,2  $\mu$ m + seringue

### Méthode :

- Préparer une solution stock de G418 à 10 mg/ml dans du MEM (diluer 1 g de poudre dans 70 ml de MEM).
- Incuber les cellules dans du milieu MEM + 10% FBS + antibiotique contenant 400 $\mu$ g / ml de G418. La sélection dure en moyenne une dizaine de jours.

## **II.7 Mesure de la cytotoxicité par dosage de protéines**

### Matériel :

- tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) : tampon phosphate 10 mM à pH 7.4 contenant 0.9% de NaCl
- Hydroxyde de sodium (NaOH) 0.5 N (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Mixture alcaline :
  - 2% carbonate de sodium (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - 0.01% sulfate de cuivre (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - 0.02% tartrate de sodium/ potassium (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Réactif phénol de Folin-Ciocalteu (Sigma, St- Louis, U.S.A.)

### Méthode :

Trois jours après le dernier stress, les protéines cellulaires sont dosées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Cette méthode se base sur le principe qu'une fois dénaturées



au NaOH, les protéines exposent leur groupement aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron, Eching, Allemagne) et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

- Rincer les cellules deux fois au PBS.
- Ajouter 1 ml de NaOH et incubé 30 minutes pour lyser les cellules et dénaturer les protéines.
- Homogénéiser le lysat et prélever une fraction de 0.4 ml.
- Parallèlement, préparer un blanc et un étalon :

Blanc : NaOH 0.5 N

Etalon : constitué d'albumine de sérum bovin (Bio-Rad, Munich, Allemagne) diluée à 100 µg/ml dans du NaOH 0.5 N

- A chaque fraction, ajouter 2 ml de mixture alcaline de 30 sec en 30 sec puis incubé pendant 15 min.
- En respectant le temps et l'ordre des tubes, ajouter 0.2ml de réactif de Folin (dilué 2X)
- Agiter immédiatement
- Après 30 min de réaction, lire la densité optique au spectrophotomètre à 660 nm.

La concentration en protéines se calcule par la formule qui suit :

Concentration en µg / ml =

$100 * (D.O. \text{ échantillon} - D.O. \text{ du blanc}) / (D.O. \text{ étalon} - D.O. \text{ du blanc}) * \text{dilution}$

## **II.8 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Griffin *et al.*, 1994)**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'amplification d'un fragment d'ADN matrice encadré de séquences connues. Ce procédé est rendu possible grâce à l'utilisation, d'une part, d'amorces oligonucléotidiques anticomplémentaires (c'est-à-dire de courts fragments d'ADN simple brin de séquence choisie et venant s'hybrider de part et

d'autre de la séquence à amplifier) et, d'autre part, par l'emploi d'une ADN polymérase thermostable.

La PCR est réalisée par l'enchaînement de cycles successifs de dénaturation de l'ADN cible, hybridation des amorces et polymérisation d'une molécule d'ADN complémentaire sur laquelle s'hybrident ces amorces. La répétition de ces cycles permet l'amplification quasi exponentielle de la séquence d'ADN cible jusqu'à l'obtention d'un plateau suite à l'épuisement des réactifs. Théoriquement, à chaque cycle est produit un nombre de molécules égal au double du nombre de molécules présent au cycle précédent.

#### Matériel :

- Amorce sens (200  $\mu$ M) (Eurogentec, Seraing, Belgique)
- Amorce antisens (200  $\mu$ M) (Eurogentec, Seraing, Belgique)
- dNTP (100 mM) (Roche, Mannheim, Allemagne)
- Tampon de la polymérase (*Pfu*) concentré 10 X (Promega, Madison, U.S.A.)
- ADN matrice
- Polymérase (*Pfu*) 2,5 unités /  $\mu$ l (Promega, Madison, U.S.A.)

Ajouter de l'eau stérile distillée pour atteindre le volume final désiré.

#### Programmation des cycles PCR :

L'appareil utilisé est le Gene Amp PCR System 9.700.

La réaction PCR utilisée pour ce travail se déroule comme suit :

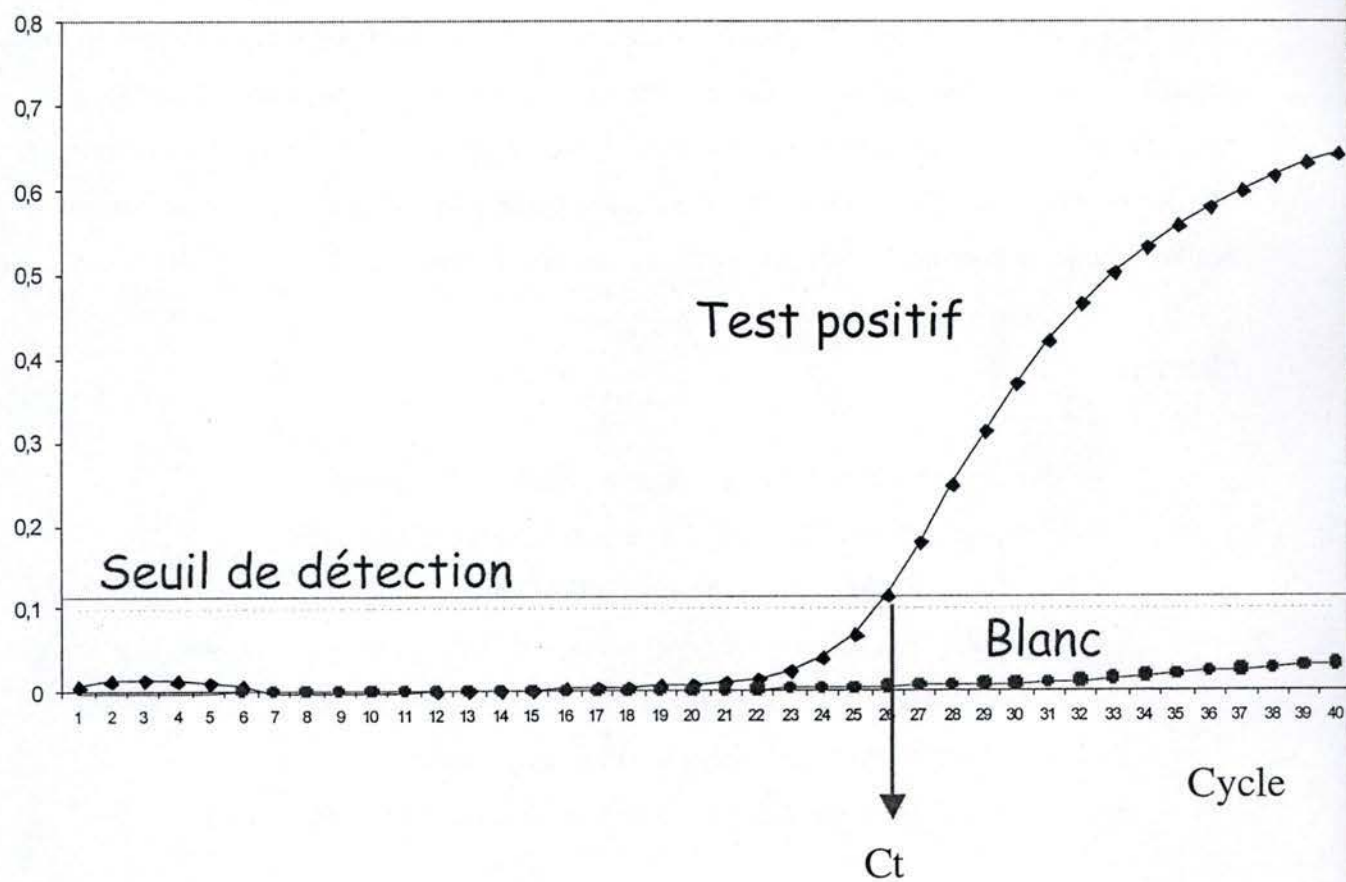
- Dénaturation longue de 5 min à 95°C.
- Série de cycles (35-40 cycles):
  - Dénaturation 30 secondes à 95°C.
  - Hybridation 1 minute à 55°C.
  - Élongation 4 minutes à 70°C (la PCR par la *Pfu* requiert au minimum 1 min par kb)

Elle se termine par une étape d'élongation de 10 min à 70°C.

Les produits PCR sont conservés à 4°C.



Fluorescence



**Figure II.3:** Courbe d'amplification obtenue par RT-PCR en temps réel, montrant la fluorescence émise par le SyBr Green en fonction des cycles PCR. Le Ct représente le cycle à partir duquel le signal de fluorescence est significativement différent du bruit de fond.

### Vérification du produit PCR :

Le produit PCR est déposé sur un gel d'agarose afin de vérifier la taille du fragment amplifié par PCR.

## **II.9 PCR en temps réel (Real-Time PCR)**

La technique de PCR en temps réel a été utilisée dans le but de valider l'expression différentielle lors de la SIPS et de la sénescence répllicative de gènes dont l'expression est modifiée par les stress subcytotoxiques au *t*-BHP ou à l'éthanol ou lors de la sénescence répllicative de fibroblastes humains en culture. Ces gènes ont été identifiés par l'étude du protéome (gels 2D) et du transcriptome (DD-RT-PCR) des cellules en SIPS et en sénescence répllicative.

### Principe :

La PCR en temps réel permet de mesurer par fluorescence l'accumulation des produits d'amplification obtenus après chaque cycle PCR. Ce système permet en effet d'associer de façon proportionnelle la quantité d'amplicons produite et l'intensité de la fluorescence mesurée dans chaque tube PCR et ce, durant chaque cycle (**Figure II.3**).

La fluorescence détectée provient d'un fluorochrome, le SyBR Green, se liant de façon non spécifique à l'ADN double brin en émettant un signal fluorescent. L'identité des produits obtenus est vérifiée en établissant une courbe de dissociation. Celle-ci est obtenue en augmentant progressivement la température de 60 à 95°C afin de dissocier les ADN bicaténaire. Le SyBR Green est alors libéré en solution ce qui entraîne une chute de la fluorescence. La dérivée de la courbe de fluorescence en fonction de la température fait apparaître un pic caractéristique de la taille et de la composition des fragments d'ADN présents. La nature des produits peut être aussi analysée par électrophorèse en gel d'agarose. L'analyse du profil d'expression d'un gène d'intérêt comprend plusieurs étapes: la première consiste à rétrotranscrire l'ARN messager en ADN complémentaire simple brin (ADNc). La deuxième est l'étape d'amplification et de détection proprement dite.



## II.9.1 Extraction d'ARN total de cultures cellulaires

Pour contrer les RNAses lors de l'extraction de l'ARN, la plupart des réactions se passent à 4°C (afin de bloquer leur action). De plus, le tampon de lyse (solution de dénaturation) contient du thiocyanate de guanidine et du  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui sont tous les deux, des inhibiteurs de RNAses. Enfin, la contamination due à des RNAses exogènes peut être évitée par l'utilisation exclusive de matériel et de produits dépourvus de RNase (RNase free).

### Matériel :

Utilisation du Kit RNAgents Total RNA Isolation System (Promega, Madison, U.S.A.) comprenant :

- Solution de dénaturation (thiocyanate de guanidine et tampon citrate / sarcosine /  $\beta$ - mercaptoéthanol)
- Acétate de sodium 2M, pH 4.0
- Phénol : Chloroforme : alcool isoamylique en proportions 125 : 24 : 1, tamponné avec 42mM de citrate de sodium, pH 4.3- 4.7
- Isopropanol
- Eau sans nucléase (RNase free)
- Ethanol à 75% (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Centrifugeuse (Beckman Avanti J- 25, U.S.A.)

### Méthode :

Le milieu de culture est entièrement décanté. La lyse des cellules est réalisée avec 4 ml de tampon de lyse (solution de dénaturation refroidie sur glace) par boîte de culture T75.

- Après avoir rajouté le tampon de lyse dans la première T75, agiter un peu la boîte afin de bien répartir la solution, puis racler à l'aide d'un râteau (sur glace).
- Récupérer le lysat cellulaire à la pipette Pasteur et le faire passer de boîte en boîte en répétant les mêmes opérations.

- Après avoir lysé toutes les boîtes, récupérer la solution contenant les cellules lysées dans un tube de 50 ml (sur glace).
- Additionner un  $1/10^{\text{ème}}$  de volume d'acétate de sodium 2M à pH 4.0 à chaque tube, puis agiter légèrement en l'inversant 4 à 5 fois.
- Ajouter 4 ml (1X le volume) de phenol : chloroforme : alcool isoamylique et mélanger en inversant d'abord les tubes 3 à 5 fois puis vigoureusement pendant 30 secondes.
- Laisser incubé sur glace pendant 15 minutes.
- Transférer le contenu du tube dans un tube corex et centrifuger pendant 20 minutes à 10.000 g, 4°C.
- Récupérer délicatement la phase supérieure (aqueuse) contenant l'ARN et la transférer dans un nouveau tube corex.
- Ajouter un volume égal (4 ml) d'isopropanol, mélanger et placer à - 20°C pendant 30 minutes pour faire précipiter l'ARN.
- Après la précipitation, l'ARN est culotté par centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes.
- Resuspendre à l'aide du vortex le culot obtenu dans 2.5 ml de solution de dénaturation.
- Ajouter 2.5 ml d'isopropanol et mettre à - 20°C.
- Centrifuger 10 minutes à 10.000 g pour culotter l'ARN.
- Laver le culot avec 10 ml d'éthanol à 75% (refroidi à - 20°C).
- Centrifuger pendant 10 minutes à 10.000 g pour culotter l'ARN.
- Laisser sécher l'ARN.
- Resuspendre le culot sec dans un volume approprié d'eau distillée.
- Prélever 0.7 µl dans 70 µl d'H<sub>2</sub>O pour doser la concentration au spectrophotomètre. (mettre à 4°C pendant le dosage). La concentration est obtenue en lisant la densité optique à 260 nm. (1 DO = 40 µg /ml d'ARN). L'absorbance est également lue à 230 nm et 280 nm. Le rapport  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$  donne une indication de la pureté de l'ARN. Il se situe idéalement entre 1.7 et 2.0. Le rapport  $A_{260 \text{ nm}} / A_{230 \text{ nm}}$  doit lui, se situer entre 1.5 et 2.0. S'il est trop faible, il témoigne de la présence résiduelle de thiocyanate de guanidine.



## II.9.2 Transcription inverse

Cette étape consiste à synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN purifié.

### Matériel :

- Oligo dT (500 ng/μl) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- Tampon (5X) pour la Superscript RII Reverse Transcriptase. (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- Dithiotréitol (DTT) 0.1M (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- dNTP mix 250 μM (Eurogentec, Seraing, Belgique)
- RNAsin (40 U/ μl) (Promega, Madison, U.S.A.)
- Superscript RII (200 U/ μl) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- Ribonucléase H (RNase H) (2 U/ μl) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- ARN extrait
- Eau sans nucléase
- Blocs chauffants (Techne Dri-Block, DB-2D, Cambridge, Grande-Bretagne) à 37°C, 42°C, et 70°C.

### Méthode :

- Mélanger l'ARN à l'oligo dT et centrifuger :
- Oligo dT (500 ng/μl)
- ARN
- ddH<sub>2</sub>O pour arriver à un total de 9.5 μl par tube.
- Incuber pendant 10 minutes à 70°C et centrifuger
- Mettre immédiatement sur glace pendant 5 minutes puis centrifuger
- Ajouter 9 μl de réaction mélange et centrifuger
- tampon RT (5X)
- DTT 0.1M
- RNAsin (40 U/ μl)
- dNTP mix 250 μM

- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 1.5 µl de Superscript RII (200 U/ µl) et centrifuger
- Incuber 1h30 à 42°C et centrifuger
- Incuber 15 minutes à 70°C et centrifuger
- Ajouter 1 µl de RNase H (2 U/ µl) et centrifuger
- Incuber pendant 20 minutes à 37°C et centrifuger
- Congeler à - 20°C

### II.9.3 Choix des couples d'amorces à partir de la séquence d'ARNm

Chaque couple d'amorces a été choisi à l'aide du programme Primer Express 5.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Les amorces ont été choisies dans des exons différents afin d'éviter la présence de produits d'amplification à partir d'ADN génomique contaminant. D'autres critères assurent la spécificité des amorces vis-à-vis de la séquence à amplifier. Ces différents critères sont :

- la longueur des amorces qui se situe entre 15 et 20 bases
- le contenu des amorces en G/C qui doit se situer entre 20 et 70%, on évitera de plus de prendre des amorces possédant 2G et/ou 2C dans les cinq derniers nucléotides
- la température de melting qui elle, doit se situer entre 58 et 60°C et qui ne peut différer de 1 à 2°C entre les deux amorces choisies
- la longueur de l'amplicon entre 50 et 150 pb.

En outre, plusieurs mises au point doivent être effectuées avant de procéder à la quantification proprement dite des différents gènes dans les différentes conditions étudiées.

### II.9.4 Détermination de la concentration optimale d'ADN matrice

Afin de déterminer l'efficacité d'amplification d'un fragment d'ADNc correspondant à chaque gène d'intérêt ainsi qu'au gène de référence, nous avons réalisé des droites standard. Celles-ci sont obtenues en réalisant des dilutions sériées (de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) de l'ADNc de départ. Une PCR en temps réel est effectuée à partir de chacune de ces dilutions. Les valeurs de Ct obtenues sont portées en graphique en fonction de la dilution réalisée. La droite passant par



les points est appelée droite standard. La pente donnée par l'équation de cette droite permet de déterminer l'efficacité de l'amplification (E). En effet,  $E = 10^{-1/\text{pente}}$ .

Matériel :

Utilisation du master mix « SyBR Green PCR » (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) contenant :

- SyBR Green I dye (2X)
- Ampli Taq Gold DNA polymerase
- dNTPs
- Passive référence (ROX)
- Tampon
- ADN complémentaire
- Eau
- Amorce sens (F) et antisens (R)
- Abi Prism 7000 sequence detection system (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)

Méthode :

- Préparer le mix :
- 12,5 µl de SyBR Green
- 2,5 µl d'amorce sens
- 2,5 µl d'amorce antisens
- 2,5 µl d'eau
- + 5 µl d'ADNc ou d'eau dans les NTC
- Vortexer le mix puis centrifuger
- Conditions PCR :
  - dénaturation initiale et activation de l'enzyme pendant 10 minutes à 95°C
  - 95°C pendant 15 secondes
  - 60°C pendant 1 minute

### II.9.5 Analyse des résultats

L'analyse des résultats commence par la détermination des Ct (cycles seuils) qui s'obtiennent en fixant le seuil de détection dans la zone d'amplification exponentielle. Pour un échantillon, ce cycle seuil correspond au cycle pour lequel on observe une intensité de fluorescence significativement plus élevée que celle du bruit de fond. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ.

Ensuite, on calcule le  $\Delta Ct$  pour chaque gène dans chacune des conditions et ce, par la formule :  $\Delta Ct = Ct \text{ du gène d'intérêt} - Ct \text{ du gène de référence}$  ;

Par après, on calcule le  $\Delta\Delta Ct$  :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ du gène d'intérêt dans les cellules tests} - \Delta Ct \text{ du gène d'intérêt dans les cellules contrôles}$ .

Une fois le  $\Delta\Delta Ct$  obtenu, on peut calculer la quantité relative de l'ARNm d'intérêt dans les différentes conditions par la formule  $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$ . Une quantité relative de 1 signifie qu'il n'y a pas de variation d'expression du gène dans la condition étudiée.

### II.10 Cultures de bactéries

#### Matériel :

- LB Broth (Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland, U.S.A.)
- Bacto™ Agar (Difco, Detroit, U.S.A.)
- Souche bactérienne Top 10 (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)

#### Méthode :

Ce milieu est préparé à partir d'eau distillée additionnée de 2% de milieu LB Broth en poudre.

- Autoclaver 25 min à 120°C.
- Laisser refroidir et ajouter les antibiotiques éventuels.
- Stocker le milieu LB (+ antibiotiques) à 4°C.



- ① Design your 5' PCR primer with CACC at its 5' end (no modification of the 3' primer is necessary).
- ② Amplify.
- ③ Mix your PCR product with a pENTR-TOPO<sup>®</sup>, incubate **5 minutes**, and transform *E. coli*.

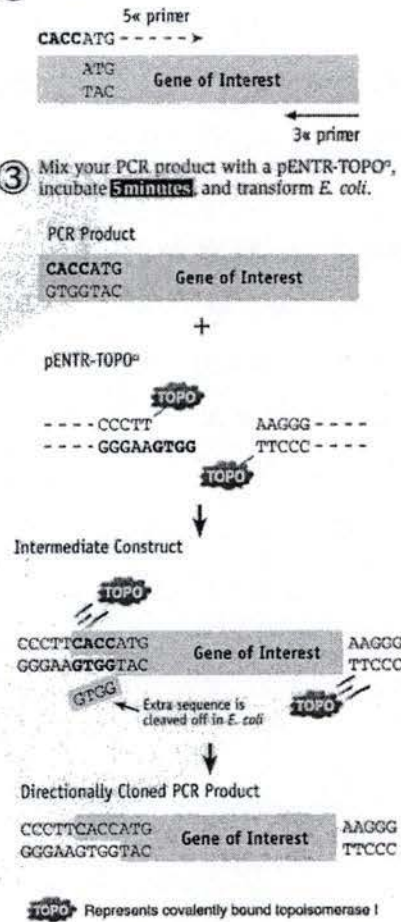


Figure 2 - The Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning Vectors

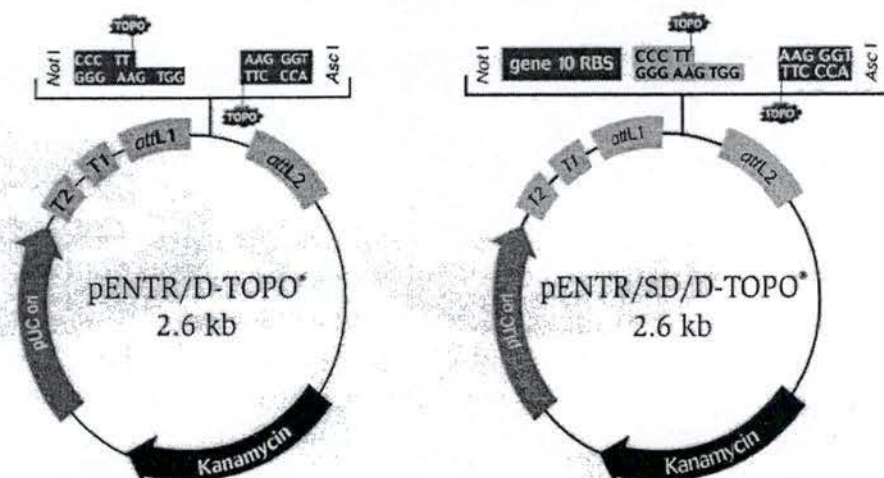


Figure II.4 : Création d'un vecteur d'entrée compatible Gateway contenant le fragment d'intérêt.

Le milieu LB solide est équivalent au milieu LB liquide auquel on a ajouté 2 % d'agar (Difco, Detroit, USA).

- Autoclaver 25 min à 120°C et puis laisser refroidir dans un bain à 60°C.
- Ajouter ensuite les additifs désirés (X-gal, IPTG, antibiotiques,...).
- Couler rapidement dans les boîtes de Pétri et laisser solidifier.
- Une fois le milieu bien solide, stocker les boîtes à 4°C.
- Laisser sécher les boîtes de Pétri 30 min sous hotte avant leur utilisation.

Les concentrations en antibiotiques utilisées dans ce travail sont respectivement de 100 µg / ml pour l'ampicilline, 50 µg / ml pour la kanamycine et 270 µg / ml pour le chloramphénicol.

## **II.11 Technique de clonage à l'aide du système Gateway**

La technologie de clonage Gateway est basée sur le système d'intégration du phage lambda au sein du génome de la bactérie hôte. Une réaction de recombinaison site spécifique entre les sites Att P du phage et les sites Att B dans le génome bactérien permet l'insertion du bactériophage dans le chromosome de la bactérie hôte.

Ces propriétés ont été mises à profit par la société Invitrogen pour développer la technologie Gateway qui permet la construction de vecteurs d'expression par recombinaison.

Pour plus d'informations sur le système Gateway et sur les différents vecteurs disponibles, il est conseillé de se référer au manuel d'utilisation disponible à l'adresse suivante : [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

### **II.11.1 Construction des vecteurs d'entrées**

Afin d'insérer les gènes d'intérêt entre les sites de recombinaison Att L1 et Att L2 et construire de la sorte nos vecteurs d'entrée, nous avons opté pour le système de clonage à l'aide du pENTR directionnel TOPO cloning kit. Le principe est illustré à la **Figure II.4** et se décompose en deux étapes.



a ) Synthèse par PCR du fragment cible

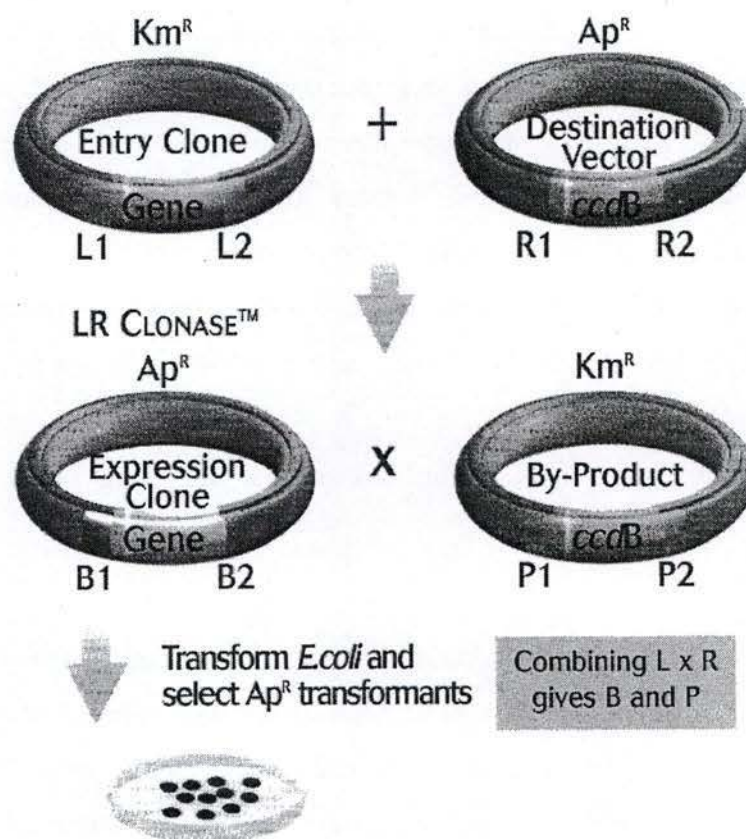
Le fragment à insérer dans le vecteur d'entrée est synthétisé par PCR. L'amorce sens contient à son extrémité 5' la séquence CACC qui assure d'une part le clonage directionnel dans le vecteur d'entrée (qui contient la séquence complémentaire) et d'autre part la présence d'une séquence Kozak unique pour une traduction efficace du gène d'intérêt lors de l'expression en cellule eucaryote. L'amorce antisens contient ou non la séquence complémentaire au codon stop du gène d'intérêt, selon que l'on souhaite exprimer une protéine non modifiée ou fusionner celle-ci avec des épiscopes C-terminaux, afin de faciliter sa détection (épitopes V5 et 6 His dans le vecteur pDEST-40, voir plus loin).

b ) Insertion du fragment cible dans le vecteur d'entrée pENTR et transformation des E. Coli Top 10

L'insertion du fragment d'intérêt dans le vecteur d'entrée est réalisée en utilisant la technologie TOPO. La ligation est assurée par la topoisomérase liée de façon covalente à l'extrémité 3' du vecteur pENTR linéarisé au site d'insertion. Le produit PCR est mélangé avec le vecteur d'entrée pENTR et incubé pendant 10 min à température ambiante puis sur glace immédiatement pour arrêter la réaction. L'étape suivante consiste à transformer une souche d'E. Coli Top 10 ( Library efficiency Top 10 competent cells, Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) avec 2 µl de mélange. Le tout est incubé sur glace pendant 20 min puis 30 sec dans un bain à 42°C pour réaliser le choc thermique et permettre ainsi la transformation. Après la transformation proprement dite, les bactéries sont placées directement sur glace. 250 µl de milieu SOC est rajouté avant que les bactéries soient placées sous agitation à 37°C pendant 30 min. La dernière étape consiste à étaler une partie de la culture sur un milieu LB + kanamycine. L'identification des clones positifs a été réalisée par analyse du profil de restriction.

### II.11.2 Construction des vecteurs de destination pDEST-40 (réaction LR)

Le vecteur pDEST-40 provient du vecteur mère pCDNA 3.1 dans lequel a été inséré une cassette compatible Gateway. Il a été utilisé pour exprimer le gène d'intérêt dans les cellules WI-38 immortalisées.



**Figure II.5:** Réaction de clonage LR pour construire un vecteur d'expression



Celui-ci contient des sites Att R1 et Att R2 en aval du promoteur CMV et en amont des séquences correspondant aux épitopes V5 et 6 His. L'insertion d'une phase ouverte de lecture se traduit donc par l'expression d'une protéine taggée, tandis que l'insertion de cette phase ouverte de lecture avec un codon stop se traduit par la synthèse d'une protéine native.

Pratiquement, l'insertion du gène d'intérêt se réalise par la recombinaison entre les sites Att L1 et Att L2 du vecteur d'entrée avec les sites Att R1 et Att R2 du vecteur de destination. Le gène de résistance au chloramphénicol et le gène ccdB sont localisés entre les sites Att R1 et Att R2 du vecteur pDEST-40 (**Figure II.5**).

Pour rappel, le produit du gène ccdB est une protéine cytotoxique qui se lie et bloque les complexes ADN-gyrase lors de la réplication de l'ADN bactérien. La présence du gène ccdB permet donc une sélection positive de clones ayant inséré le gène d'intérêt, la séquence du gène ccdB étant excisée lors du processus de recombinaison.

La recombinaison est assurée par un mélange d'enzymes appelé LR clonase enzyme mix (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.).

#### Matériel :

Utilisation du kit « Invitrogen Gateway™ LR CLONASE™ Enzyme mix (stocké à -70°C) :

- vecteur de destination (pDEST40)
- tampon de réaction LR
- tampon TE
- Enzyme LR clonase
- vecteur d'entrée

#### Méthode :

- Préparer le mélange.
- Incuber pendant 60 minutes à 25°C.
- Ajouter 2 µl de solution Proteinase K et incuber pendant 10 minutes à 37°C après avoir vortexé et centrifugé le mélange.
- Transformer les cellules compétentes DH5  $\alpha^{\text{TM}}$  avec 1 µl de réaction LR.
- Incuber pendant 30 minutes sur glace.

- Incuber pendant 30 secondes à 42°C (choc thermique).
- Ajouter 250 µl de milieu SOC et incuber pendant 60 minutes à 37°C.
- Etaler 10 et 100 µl de la transformation sur milieu LB + ampicilline.
- De la même manière, les clones positifs ont été identifiés par analyse du profil de restriction des candidats.

## **II.12 Mini- préparation d'ADN plasmidique**

Les principales étapes de cette technique sont :

- La lyse alcaline des bactéries
- La liaison de l'ADN à une colonne de silice
- L'élution de l'ADN

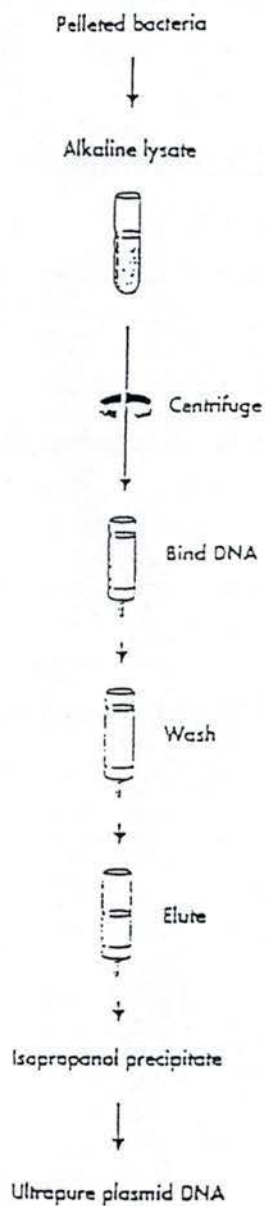
Matériel :

Utilisation du Kit « QIAprep Spin Miniprep using a microcentrifuge :

- tube microcentrifuge
- tampon P1
- Tris- HCl (50 mM ; pH 8)
- EDTA (10 mM)
- RNase A (100 µg/ml)
- tampon P2
- NaOH (200 mM)
- SDS 1%
- tampon N3
- colonnes (Qiagen, Hilden, Allemagne)
- tampon PB
- tampon PE
- tampon EB (10 mM Tris- HCl, pH 8.5)
- centrifugeuse de table (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)



QIAGEN Plasmid Maxi Kit



Hands-on time	30 minutes
Total time	145 minutes

**Figure II.6:** Etapes menant à la purification de l'ADN plasmidique.

Méthode :

- Prélever stérilement une fraction de la culture liquide et conserver le reste à -70°C après ajout de 15% de glycérol.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 13.000 rpm, 4°C. (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Resuspendre le culot bactérien dans 250  $\mu$ l de tampon P1. S'assurer que la RNase a bien été rajoutée au tampon. (Conserver à 4°C)
- Ajouter 250  $\mu$ l de tampon P2 et inverser les tubes 4 à 6 fois pour mélanger.
- Laisser pendant 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 350  $\mu$ l de tampon N3 et inverser le tube immédiatement mais calmement 4 à 6 fois.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 13.000 rpm, 4°C. (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Récupérer le surnageant (750  $\mu$ l) et le placer sur la colonne.
- Centrifuger pendant 1 minute à 13.000 rpm, 4°C et jeter l'éluat.
- Laver la colonne avec 500  $\mu$ l de tampon PB et centrifuger pendant 1 minute à 13.000 rpm, 4°C et jeter l'éluat.
- Laver la colonne avec 750  $\mu$ l de tampon PE et centrifuger pendant 1 minute à 13.000 rpm, 4°C et jeter l'éluat.
- Répéter cette étape une nouvelle fois.
- Placer la colonne sur un nouvel eppendorf.
- Eluer l'ADN en ajoutant 30 ou 50  $\mu$ l de tampon EB ou de l'eau distillée et centrifuger pendant 1 minute à 13.000 rpm, 4°C.
- Prélever 5  $\mu$ l d'ADN et le mettre dans 95  $\mu$ l d'eau pour doser l'absorbance au spectrophotomètre. (GeneQuant)

### **II.13 Maxi-préparation d'ADN plasmidique :**

La maxi-préparation permet de purifier de grandes quantités d'ADN plasmidique. Cette technique utilise une colonne échangeuse d'anions sur laquelle s'adsorbe l'ADN plasmidique, ce qui permet de le séparer des protéines, des débris cellulaires, de l'ARN et de l'ADN génomique (**Figure II.6**)



Matériel :

Kit de purification de plasmides : Kit « Qiagen plasmid Maxi kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne) :

- Tampon de resuspension (P1) :
  - 50 mM Tris-HCL pH 8,0
  - 10 mM EDTA
  - 100 µg/ml RNase A)
  - (Conservation à 4°C après avoir ajouté la RNase A)
- Tampon de lyse (P2) :
  - 200 mM NaOH, 1 % SDS
  - (Conservation à température ambiante)
- Tampon de neutralisation (P3) :
  - 3 M d'acétate de K
  - (Conservation à 4°C)
- Tampon d'équilibrage des colonnes (QBT) :
  - 750 mM NaCl
  - 50 mM MOPS, pH 7,0
  - 15 % d'isopropanol
  - 0,15 % Triton X-100
- Tampon de lavage (QC) :
  - 1 M NaCl
  - 50 mM MOPS, pH 7,0
  - 15 % d'isopropanol
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante.
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à -20°C.

Méthode :

Si le plasmide est présent en grand nombre de copies au sein de la bactérie hôte, 100 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) sontensemencés avec 100  $\mu$ l d'une culture liquide issue d'une mini-culture.

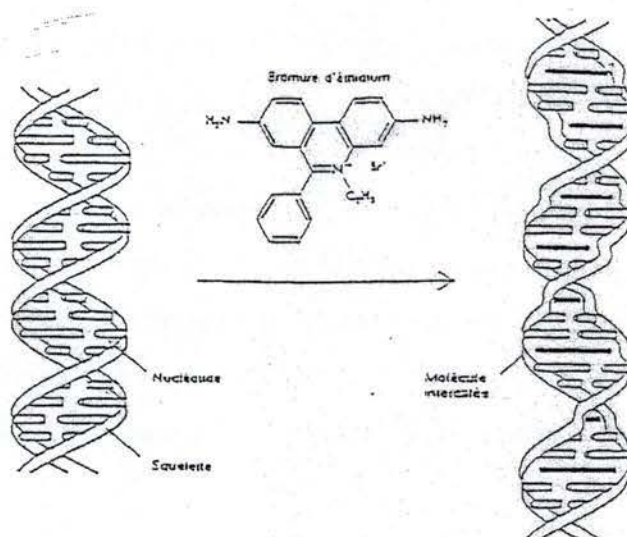
Si le plasmide est présent en faible nombre de copies au sein de la bactérie, 250 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) sontensemencés avec 1 ml d'une culture liquide issue d'une mini-culture.

- Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation à 250 rpm.
- Centrifuger la culture à 6.000g pendant 15 minutes (Beckman Avanti J- 25, rotor JLA- 16.250) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1.
- Ajouter 10 ml de tampon P2 et mélanger doucement, puis laisser 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 10 ml de tampon P3 et agiter doucement puis laisser 20 min sur glace.
- Centrifuger 30 min à 4°C à 20.000g (Beckman Avanti J- 25, rotor JA-20) et récupérer le surnageant.
- Équilibrer les colonnes Qiagen-Tip 500 avec 10 ml de tampon QBT et laisser la colonne se vider par gravité.
- Déposer le surnageant sur la colonne.
- Laver la colonne avec 2 x 30 ml de tampon QC.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 15 ml de tampon QF.
- Récupérer l'éluat dans un Corex de 30 ml en verre.
- Précipiter l'ADN avec 0.7 volume (10,5 ml) d'isopropanol.
- Centrifuger 30 min à 15.000g à 4°C (Beckman Avanti J- 25, rotor JA-20) et éliminer le surnageant.
- Laver avec 5 ml d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 10 min à 15.000g à 4°C (Beckman Avanti J- 25, rotor JA-20).
- Décanner le surnageant délicatement.
- Sécher le culot pendant 30 minutes (retourner les tubes sur du papier et les mettre à 37°C.
- Resuspendre le culot dans 250 à 500  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O distillée stérile.
- Conserver à -20°C.



Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécules d'ADN (Kb)
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2	0,1-2,0

**Figure II.7 :** Concentration en agarose en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer



**Figure II.8 :** Structure et localisation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN (Watson, J.D. *et al.*, 1989).

## **II.14 Restrictions enzymatiques**

Les enzymes utilisées nous ont été fournies par Promega, Madison, U.S.A. Le mélange réactionnel est constitué du tampon de restriction préconisé par le fournisseur, de l'ADN à digérer et de l'enzyme (2-10 U /  $\mu\text{g}$  d'ADN) et de l'enzyme. Les réactions sont réalisées durant 1 à 2h à 37°C.

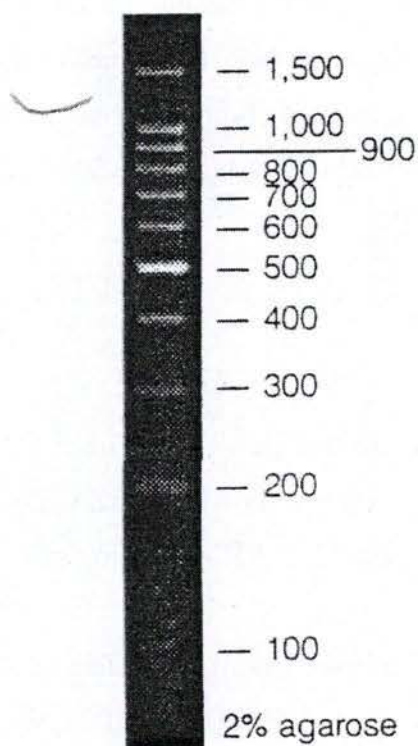
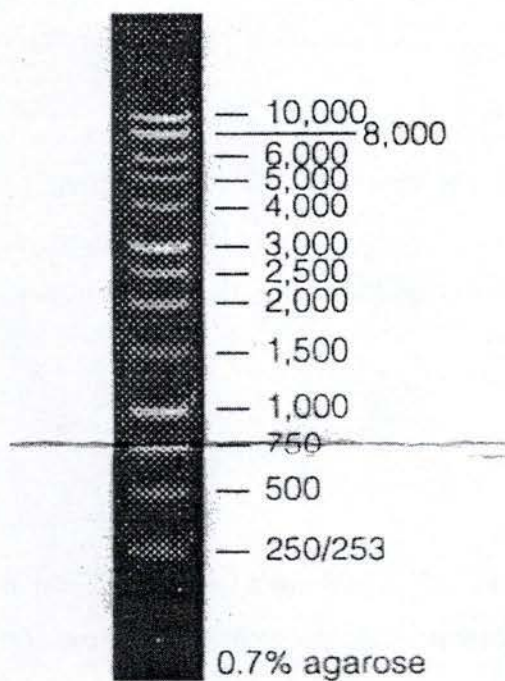
## **II.15 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Cette technique consiste à séparer des molécules d'ADN selon leur taille sous l'action d'un champ électrique constant appliqué sur un gel constitué de polymères d'agarose. Le pourcentage en agarose est déterminé en fonction des tailles respectives des fragments à séparer (**Figure II.7**). Des gels de haut pourcentage en agarose permettent de séparer des fragments d'ADN de petite taille et inversement. La taille des fragments obtenus après digestion est estimée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire. Les fragments dans le gel, sont visualisés par l'ajout d'une solution de bromure d'éthidium dans le gel, molécule qui est fluorescente quand elle s'intercale dans les bases de l'ADN bicaténaire (**Figure II.8**). L'ADN est visualisé sous illumination UV.

### **Matériel :**

- Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- Transilluminateur, longueur d'onde : 392 nm (Analis, Namur, Belgique)
- Appareil photo: Kaiser RA1 + Photo-pront IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France)
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)
- TBE 1 X (Tris-borate 0,9 M ; EDTA 0,002 M), stock TBE 10X (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- Lampe U.V. (Vilber-Lourmat, France)
- Générateur EPS 500 / 400 (Pharmacia, Suède)
- Bromure d'éthidium, solution stock de 500  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma, St Louis, USA)
- Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Richmond, USA)





**Figure II.9** : Etalons de poids moléculaire (1Kb : au- dessus ; 100pb : en- bas) permettant d'estimer la taille des fragments d'ADN lors d'électrophorèse en gel d'agarose..

- Tampon de charge (6X Load dye):
  - Glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - SDS 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Bleu de bromophénol 0,1 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique)
- Marqueurs ADN de poids moléculaire utilisés (**Figure II.9**) :
  - 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, USA)
  - 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, USA)

Méthode :

- Porter à ébullition un volume approprié d'un mélange contenant du TBE 1X additionné de 0,5 à 2 % d'agarose selon la taille des fragments à séparer.
- Ajouter le bromure d'éthidium (dilué 5000X) à cette solution.
- Couler sur le support *ad hoc* muni de peigne(s) et laisser solidifier le gel.
- Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X.
- Déposer les échantillons contenant le tampon de charge dans les puits du gel.
- Faire migrer les échantillons à un voltage compris entre 80 V et 120 V. Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode, à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille.
- Arrêter l'électrophorèse et visualiser les différents fragments dans le gel sous une illumination U.V.
- Photographier le gel.

## **II.16 Le séquençage**

Les réactions de séquençage d'ADN plasmidique ont été réalisées au sein du département de médecine (Neurobiologie) des FUNDP. La technique utilisée repose sur l'incorporation par PCR de nucléotides fluorescents . Suivant les ADN à séquencer, les amorces universelles « M13 sens », « M13 antisens », « BHG » ont été utilisées.



## **II.17 Western blot**

L'électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-page) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Le transfert de celles-ci sur membrane de nitrocellulose ou de polyvinylidène difluorure (PVDF) permet en outre leur détection à l'aide d'un anticorps spécifique (anticorps primaire) et d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. La détection est réalisée en présence du substrat de la peroxydase et du luminol. L'oxydation du luminol s'accompagne d'émission de lumière qui peut être détectée à l'aide d'un film autoradiographique.

### **II.17.1 Préparation des lysats cellulaires**

- Rincer les cellules au PBS puis lyser directement à l'aide du réactif M-PER (Pierce, Rockford, U.S.A.) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases.
- Collecter le lysat et centrifuger 10 min à 13.000 g pour éliminer les débris cellulaires.

#### Matériel :

- extraits cellulaires de fibroblastes WI-38 ou WI-38 / SV40 transfectés ou non
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Minigel NUPAGE (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Tampon de migration :
  - tampon MOPS : 50 ml (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
  - eau distillée : porter à 1 litre
- Minicuve (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Etalons de poids moléculaire :
  - Seeblue plus 2 pre-stained protein standard (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
  - ProSieve color protein markers (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA)
  - Magicmark western standard (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Eponges

- Papiers Whatman (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Membrane PVDF (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Uppsala, Suède)
- - Tampon de transfert :
  - tampon de transfert NU PAGE : 5ml (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
  - méthanol : 10ml (20ml si deux gels)
  - eau distillée : porter à 100ml
- Générateur (Biorad Power PAC 300)
- Tampon de rinçage (TBS-Tween) :
  - TBS (100x)
  - Tween 20 (1000x) : Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (Sigma, St Louis, USA)
  - Porter à volume avec de l'eau distillée
  - Gloria (5%) (Gloria, Nestlé, Belgique)
- Anticorps primaires
  - PK : Anticorps monoclonal de souris anti PKM de rat et d'humain
  - AOP2 : Anticorps reçu de l'équipe du Pr. Fisher (Université de Pennsylvanie)
  - HSP27 : Anticorps monoclonal de souris (Biotech, Santa Cruz)
  - alpha-Tubuline : Anticorps monoclonal de souris (Innogenex, UK)
- - Anticorps secondaires
  - Anticorps de mouton anti-souris (Amersham Pharmacia Biotech, UK)
  - Anticorps de singe anti-lapin
- - Substrat de révélation :
  - Western lightning chemoluminescence reagent plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA)
  - Supersignal west Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, USA)
  - Supersignal west Pico maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, USA)
- Film autoradiographique (Biotech, Buckinghamshire, Angleterre)



Méthode :

- Décongeler les extraits cellulaires et faire bouillir 4 minutes en présence du tampon de charge.
- Centrifuger 10 min à 13000 rpm pour précipiter les débris cellulaires insolubles.
- Déposer les échantillons sur gel et laisser migrer durant environ 1 heure (sous 200V), dans le tampon de migration (20x).
- Enlever le gel du moule et retirer le stacking gel (les puits) ainsi que la bande inférieure du gel à l'aide d'une spatule.
- Effectuer le montage suivant :
  - électrode négative
  - 2 éponges imbibées de tampon de transfert NUPAGE
  - 2 whatmans imbibés de tampon de transfert NUPAGE
  - gel
  - membrane PVDF préalablement équilibrée dans le méthanol, rincée à l'eau et imbibée de tampon de transfert NUPAGE
  - 2 whatmans imbibés de tampon de transfert NUPAGE
  - 2 éponges imbibées de tampon de transfert NUPAGE
  - électrode positive
- Transfert des protéines du gel sur la membrane PVDF en présence de tampon de transfert (et d'eau dans le reste de la cuve de manière à éviter une surchauffe sous l'effet du courant) : sous 30V durant au moins 2 heures.
- Bloquer la membrane en présence de TBS-T + gloria (5%) durant 1 heure sur un rotateur (dans un biberon).
- Incuber la membrane avec les anticorps primaires dilués dans du TBS-T + gloria (5%) durant une heure sur rotateur.
- Rincer la membrane 3 fois durant 5 min avec du TBS-T + gloria (5%).
- Incuber la membrane avec les anticorps secondaires dilués dans du TBS-T + gloria (5%) durant une heure sur rotateur.
- Rincer la membrane une fois 5 min avec du TBS-T + gloria(5%), deux fois 5 min avec du TBS-T seul et une fois 10 min avec du TBS-T seul.

- Placer la membrane durant 5 min en présence du substrat de la peroxydase sur rotateur.
- En chambre noire, exposer un film autoradiographique sur la membrane de manière à obtenir une révélation optimale.
- Placer le film dans la solution de révélation (environ 1 min).
- Rincer à l'eau puis placer dans la solution de fixation.
- Rincer de nouveau à l'eau courante.



**Résultats  
et  
Discussions**

### **III RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Nous avons vu, dans l'introduction de ce mémoire, que des études transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées sur des fibroblastes humains pour identifier des gènes dont l'expression varie lors de la sénescence répllicative ou lors de la sénescence prématurée induite par des stress subcytotoxiques (SIPS).

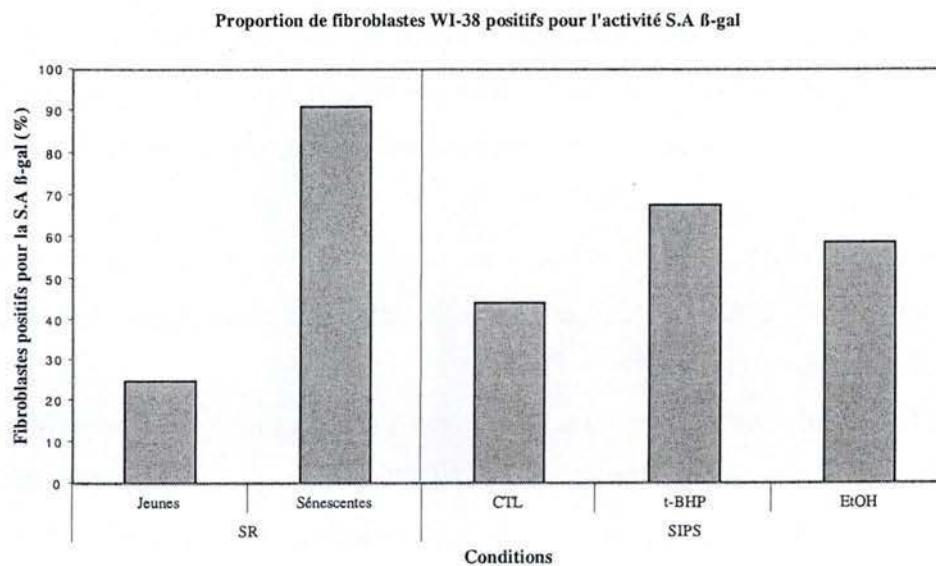
La première partie de notre travail a consisté à vérifier les résultats obtenus par DD RT-PCR, et à mettre en évidence l'expression différentielle de certains gènes, par la technique de la RT-PCR en temps réel.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes focalisés sur un nombre limité de gènes dont l'expression différentielle en SIPS ou en sénescence répllicative a été démontrée. Ces gènes sont la pyruvate kinase, la protéine chaperone HSP27 et la 1 cys-peroxyredoxine ou AOP2. Nous avons plus particulièrement investigué un effet protecteur éventuel de la surexpression de ces gènes vis-à-vis de stress cytotoxiques (éthanol ou *t*-BHP). Cette approche sous-entend la construction de vecteurs d'expression à l'aide du système Gateway, la transfection stable de fibroblastes WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40 et l'analyse d'un effet protecteur vis-à-vis des stress par l'établissement de courbes de survie des cellules transfectées.

#### **III.1 Culture cellulaire et extraction de l'ARN**

Afin de disposer d'extraits d'acides nucléiques provenant de cellules en SIPS, ou en sénescence répllicative, nous avons réalisé une série de cinq stress successifs sur des fibroblastes humains de poumons fœtaux WI-38, et ce, à raison d'un stress par jour pendant une heure pour le *t*-BHP et deux heures pour l'éthanol. Nous avons également utilisé des cellules sénescents. Une période de 48 heures de récupération est alors laissée aux cellules. Les biomarqueurs de la sénescence apparaissent endéans ces 48 heures. En parallèle, nous avons réalisé deux types de contrôles. Il s'agit d'une part de cellules jeunes n'ayant subi aucun stress définies par le terme "J0" (jour 0) et d'autre part, de cellules soumises aux mêmes traitements que les cellules stressées mais en absence de molécule stressante. Ces dernières, définies par le terme de contrôle, permettent de discriminer les effets dus aux changements de milieu par rapport aux effets dus aux stress eux-mêmes. Nous avons également utilisé des cellules sénescents qui ont effectué 50 DCPs. Afin de vérifier l'état de





**Figure III.1:** Proportion de cellules présentant l'activité S.A  $\beta$ -gal dans les différentes conditions testées.

J0: cellules « jour 0 »

CTL: cellules contrôles

*t*-BHP: cellules en SIPS induite par le *t*-BHP

EtOH: cellules en SIPS induite par l'éthanol

Sén: cellules en sénescence réplivative

sénescence répliquative de nos cellules ou l'effet des stress à l'éthanol ou au *t*-BHP, nous avons analysé deux biomarqueurs communs à la SIPS et à la RS, à savoir : l'activité S.A  $\beta$ -gal ainsi que l'arrêt de prolifération cellulaire par l'incorporation de thymidine tritiée rapportée à la quantité de protéines cellulaires. Nous avons effectué une extraction d'ARN total à partir des cellules stressées ou sénescents. L'ARNm a ensuite été rétrotranscrit en ADNc servant de matrice pour la PCR en temps réel.

### III.1.1 Cellules positives pour l'activité S.A $\beta$ -gal

#### Résultats

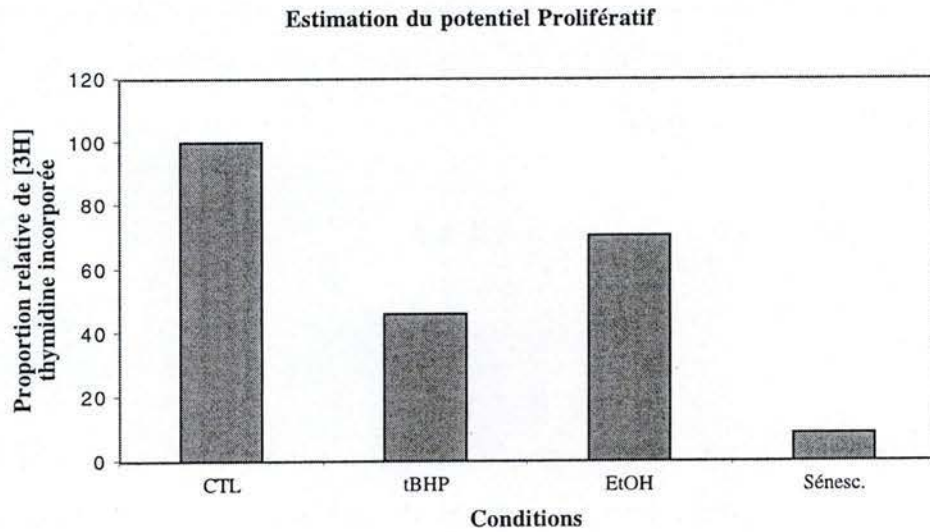
La **figure III.1** montre la proportion de cellules positives pour l'activité S.A  $\beta$ -gal pour les différentes conditions testées. Dans le cas des cellules en sénescence répliquative, nous constatons une augmentation d'un facteur 3,5 par rapport aux cellules "J0".

De même, la proportion de cellules exprimant l'activité S.A  $\beta$ -gal est plus élevée chez les cellules en SIPS induite par le *t*-BHP ou l'éthanol. Les valeurs sont proches de 59% et 68% respectivement, ce qui correspond aux résultats obtenus précédemment dans le cas de stress au *t*-BHP (Dumont *et al.*, 2000) ou à l'éthanol.

#### Discussion

Les résultats obtenus démontrent une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité S.A  $\beta$ -gal, tant pour les cellules en sénescence répliquative que pour les cellules en SIPS induite par les stress au *t*-BHP ou à l'éthanol. Dans le cas de la SIPS, cette augmentation est cependant moins marquée. Ces données confirment des travaux montrant que les cellules en SIPS ressemblent à des cultures pré-sénescents, en ce qui concerne plusieurs biomarqueurs de sénescence (Dumont *et al.*, 2000). L'augmentation de cellules positives pour la S.A  $\beta$ -gal dans la population de cellules « contrôle » est légèrement supérieure à ce qui avait été observé précédemment. Nos résultats démontrent donc que les stress ont été correctement réalisés et valident les ARN extraits de ces cellules pour vérifier l'expression différentielle des gènes d'intérêt.





**Figure III.2:** Graphique montrant la proportion relative de thymidine tritiée incorporée par les cellules dans les différentes conditions testées. L'incorporation de thymidine tritiée a été normalisée par la quantité de protéines dans les puits (équivalente au nombre de cellules par puits). Les résultats sont exprimés en %, la situation « contrôle » étant considérée comme étant 100%.



**Figure III.3:** Courbes d'amplification réalisées dans 4 tubes PCR distincts à partir du même échantillon d'ADNc de départ (23 kDa HBP) témoignant de la reproductibilité de la technique de PCR en temps réel.



### III.1.2 Mesure du potentiel prolifératif

#### Résultats

La **figure III.2** représente l'estimation du potentiel prolifératif des fibroblastes WI-38, dans différentes situations testées (cellules contrôles, cellules stressées au *t*-BHP ou à l'éthanol, cellules sénescents), par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN, celle-ci est normalisée par rapport à la quantité totale de protéines cellulaires. Nous savons en effet que celle-ci reflète le nombre de cellules lors de l'étape d'incorporation (Dumont *et al.*, 2000).

Par rapport aux cellules « contrôles » (100%), l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules sénescents ou les cellules stressées par l'éthanol ou le *t*-BHP est fortement diminuée. On observe en effet des diminutions respectives de 29%, 54% et 91%. Des travaux précédents ont montré que le potentiel prolifératif des cellules contrôles avant stress et des cellules contrôle de stress était très similaire (Chainiaux *et al.*, soumis).

#### Discussion :

Lorsque les fibroblastes sont cultivés *in vitro*, leur potentiel prolifératif diminue au gré des générations successives. L'incorporation de thymidine tritiée permet de mettre cette propriété en évidence (Dumont *et al.*, 2000). Dans nos expériences, la diminution du potentiel prolifératif des cellules en SIPS est moins importante que chez les cellules sénescents.

Les résultats de ces expériences corréleront les données relatives à la S.A  $\beta$ -gal et les résultats obtenus lors d'études précédentes. Les ARN que nous avons extraits seront donc utilisés en toute confiance lors de la RT-PCR en temps réel.

### III.2 Expression différentielle

72 h après le dernier stress, nous avons procédé à l'extraction de l'ARN des différentes populations cellulaires (cellules "J0", « contrôles », cellules stressées au *t*-BHP ou à l'éthanol, sénescents). L'ARN a ensuite été rétrotranscrit en ADNc en utilisant un oligo-d(T) comme amorce. Les courbes d'amplification représentées à la **figure III.3** ont été

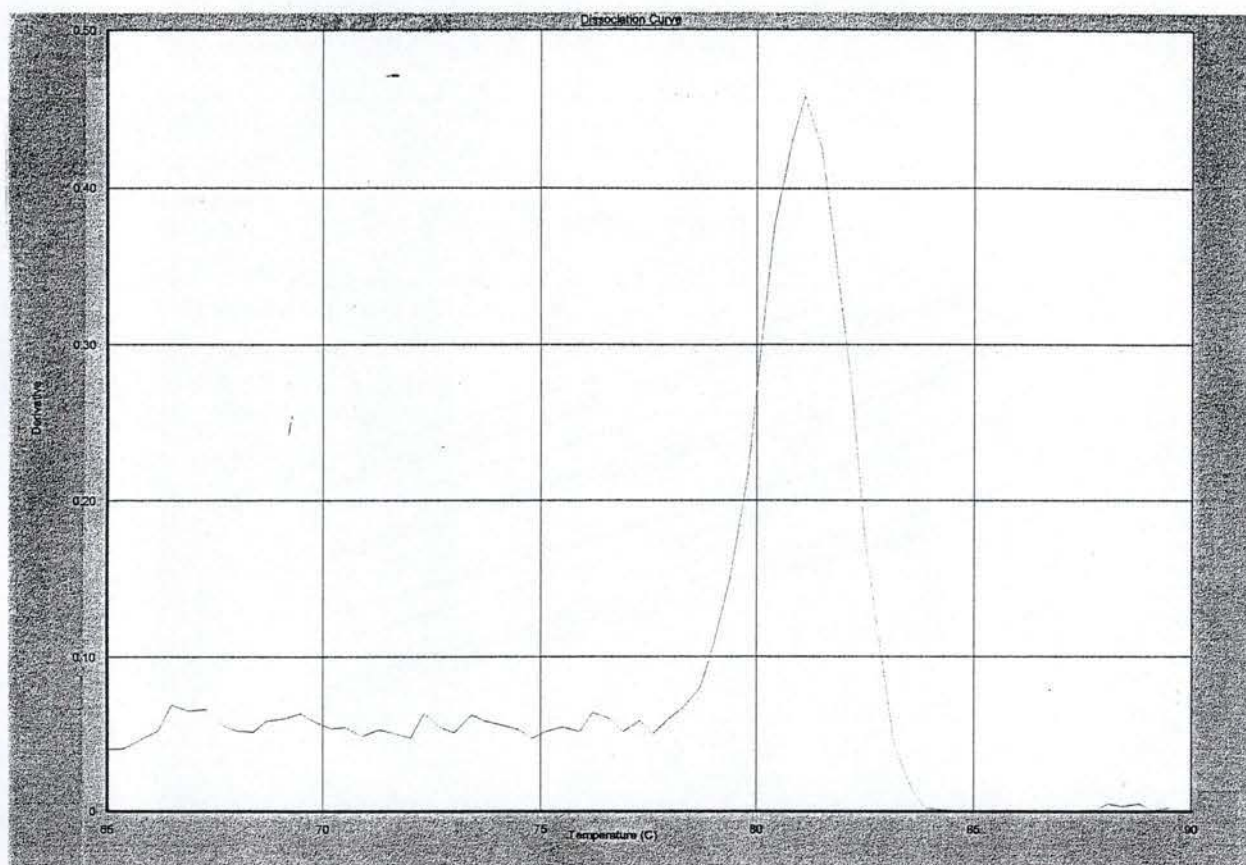
Abréviations	Noms
KPNB1	Karyophérine bêta-1
CRP2	Protéine de progression du cycle cellulaire 2
ARPC2	Protéine du complexe 2 / 3 relié à l'actine
S100A4	Protéine de liaison au calcium S100A4, calvasculine ou encore métastatine
S100A13	Protéine de liaison au calcium S100A13
M83	Protéine transmembranaire M83
ApoL	Apolipoprotein L
RPN2	Ribophorine 2
HSP27	Protéine chaperone 27
AOP2	1-cys peroxyredoxine
PK2M	Pyruvate kinase
G6PD	Glucose-6-phosphate déhydrogénase

**Figure III.4:** tableau reprenant les noms et les abréviations correspondants aux 12 candidats analysés par PCR en temps réel



Gènes	Amorces sens		Amorces anti-sens		Amplicons	
	Séquences	Tm (°C)	Séquences	Tm (°C)	Tailles (pb)	Tm (°C)
<b>23 kDa HBP</b>	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG	60	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT	60	134	82
<b>APOL</b>	TGAGGCCTGGAACGGATTC	60	TTGCAAGGTTGTCCAGAGCTTTA	60	86	82
<b>ARPC2</b>	GCCAGTGCTCGAGACAACAC	58	TCAGCACCTTGAGGAAGTCAGA	59	133	81
<b>CPR2</b>	ACCTTGCCCAGCCAACTG	58	GCAAGTCCTTCTTCCGGCTGTT	59	104	84
<b>G6PD</b>	CGTGAGGCCTGGCGTATTT	60	GGATGGGCTTGGGCTTCT	59	67	84
<b>HSP27</b>	TCCCTGGATGTCAACCACTTC	58	CTCGTGCTTGCCGGTGAT	59	84	85
<b>KPNB1</b>	ATTGCTGGAGATGAGGATCACA	58	TCCTTCCCAAATGCTGTACATAAG	58	86	79
<b>M83</b>	ACGGCTCAAGACAGTCCTGAA	59	CTGCGGTCCAGCTGCAA	59	81	82
<b>PK2M</b>	CGGGTGAACCTTGCCATGA	59	CCATCCGGTCAGCACAAATG	59	81	82
<b>RPN2</b>	ACCGTGGTGTCCAATACATTCA	59	TGAAATATAATCGTGCTAGGAGCAAA	59	125	80
<b>S100A4</b>	CGCTTCTTCTTTCTTGGTTTGATC	59	CCCTCTTTGCCCAGTACTTG	60	107	82
<b>S100A13</b>	CTCAGCGTCAACGAGTTCAAAG	59	CCAAGCTCTTCATCTTCTCATCAA	59	94	81

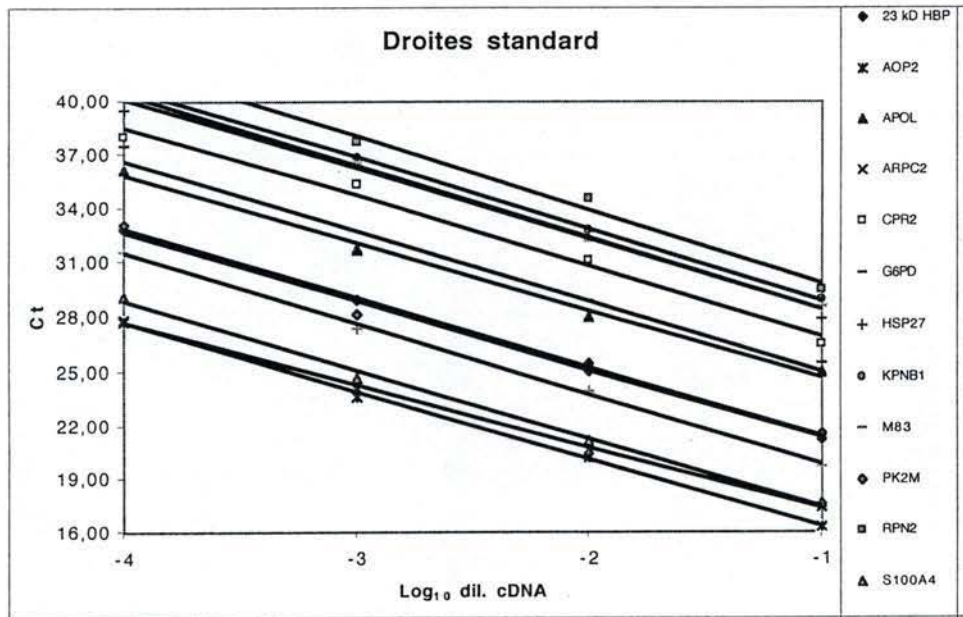
**Figure III.5:** Tableau reprenant les séquences et les Tm des différentes amorces sens et antisens utilisées lors de la PCR en temps réel, ainsi que les tailles et Tm théoriques des amplicons générés par ces couples d'amorces.



**Figure III.6:** Courbe de dissociation permettant de vérifier la nature des amplicons. Le graphique représente la dérivée du signal de fluorescence générée par le SyBr Green en fonction de la température. La courbe de dissociation illustrée montre un pic à la température de 81°C ce qui correspond à la  $T_m$  du candidat S100A13.



a)



b)

	Pente	Efficiencia
23 kD HBP	-3,84	1,82
AOP2	-3,78	1,84
APOL	-3,71	1,86
ARPC2	-3,46	1,95
CPR2	-3,87	1,81
G6PD	-3,85	1,82
HSP27	-3,89	1,81
KPNB1	-3,95	1,79
M83	-3,98	1,78
PK2M	-3,77	1,84
RPN2	-4,10	1,75
S100A4	-3,80	1,83
S100A13	-3,88	1,81

**Figure III.7:** a) Graphique représentant les droites standard, réalisées à partir des valeurs de cycle seuil reportées en fonction de la dilution d'ADNc.

b) La pente de l'équation de chaque droite standard obtenue donne une indication sur l'efficiencia d'amplification du fragment d'ADNc correspondant au gène étudié.

réalisées dans 4 tubes PCR distincts à partir du même échantillon d'ADNc de départ, le 23 kDa highly basic protein (HBP). Elles témoignent donc de la reproductibilité de l'expérience.

Afin de réaliser la quantification du niveau relatif des ARN messagers correspondant aux 12 gènes auxquels nous nous intéressons (**figure III.4**) dans les différentes conditions expérimentales, nous avons défini, pour chacun d'entre eux, un couple d'amorces. Les différentes amorces que nous avons utilisées sont reprises dans le tableau de la **figure III.5**.

Nous avons contrôlé la nature des produits amplifiés par RT-PCR en temps réel en réalisant des courbes de dissociation, l'une d'entre elles est représentée à la **figure III.6**. Aucun pic correspondant à la formation de dimères d'amorces ou de produits aspécifiques n'a été observé.

### III.2.1 Détermination des efficacités d'amplification

Nous avons, pour chacun des gènes, établi une droite standard en réalisant, pour chaque gène étudié, une PCR en temps réel à partir d'une série de dilutions de  $10^{-1}$  en  $10^{-4}$  de l'ADNc de départ. La méthode de quantification utilisée pour traiter les résultats de PCR en temps réel (voir matériel et méthodes) requiert que l'efficacité de PCR soit comparable pour les gènes d'intérêt et pour le gène de référence (ici, 23 kDa HBP). Nous pouvons observer que les pentes des droites standard obtenues pour le gène de référence et pour chaque gène d'intérêt sont similaires. Les efficacités d'amplification sont donc comparables pour tous les gènes étudiés, ce qui nous permet de normaliser le niveau des transcrits d'intérêt par rapport à celui de 23 kDa HBP (**figure III.7**).

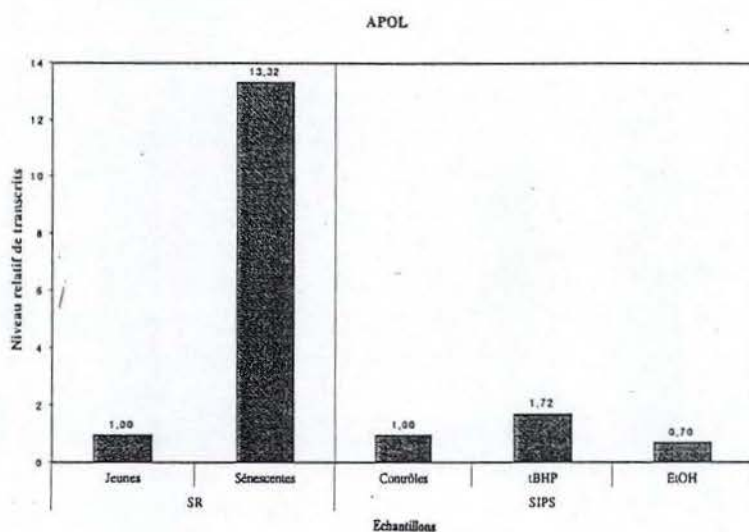
### III.2.2 Quantification des niveaux relatifs de transcrits des gènes d'intérêt

Après avoir optimisé les conditions de la PCR, nous avons quantifié le niveau relatif des transcrits des gènes d'intérêt par rapport à celui de notre gène de référence (23 kDa HBP) et ce, pour les cellules stressées ou en sénescence répliquative.

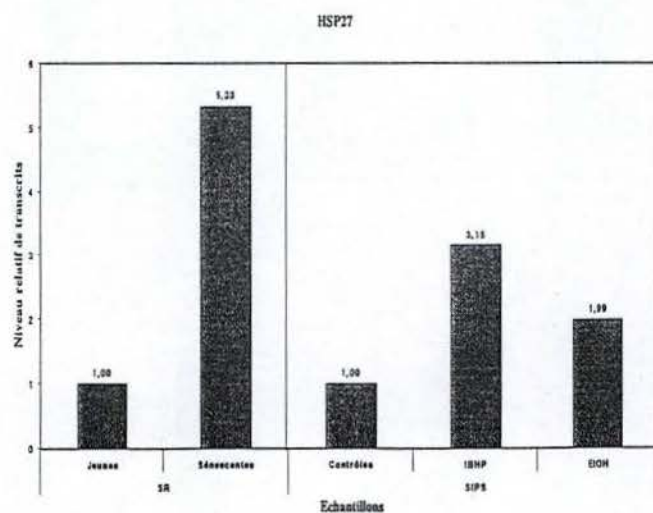
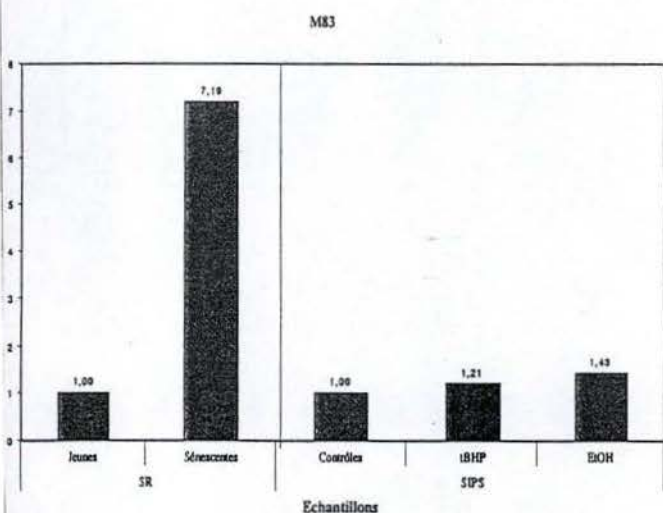
L'analyse des résultats commence par la détermination du Ct. L'expression relative des différents gènes a été calculée par la méthode des  $\Delta\Delta Ct$ , dont le principe est décrit dans le matériel et méthodes.



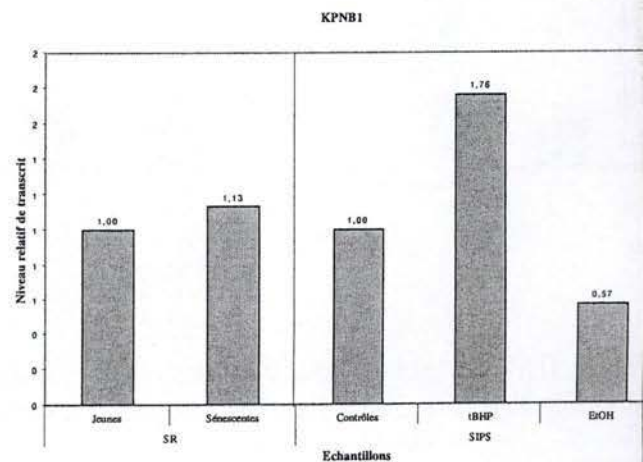
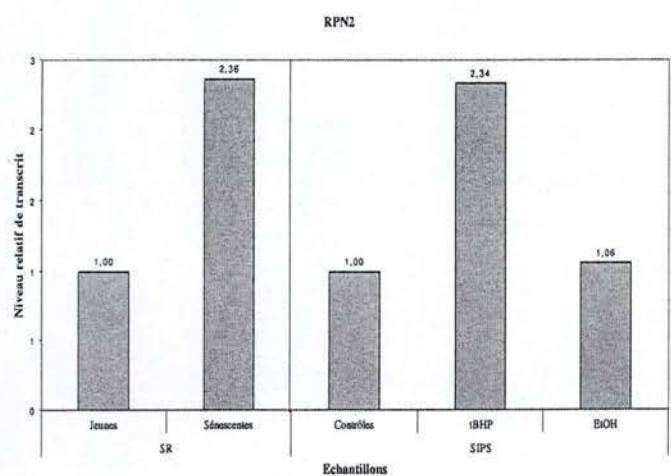
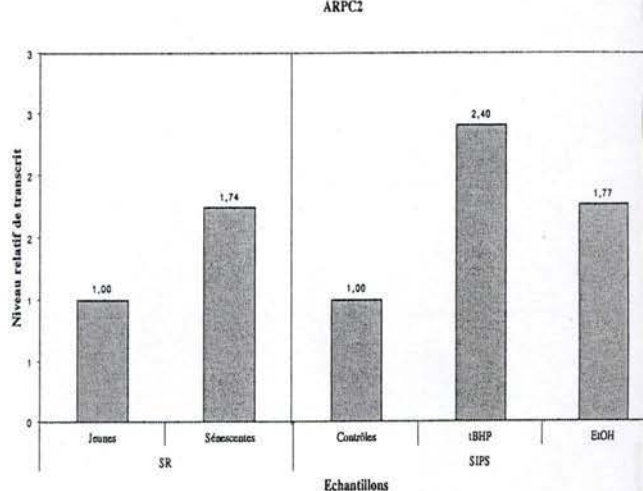
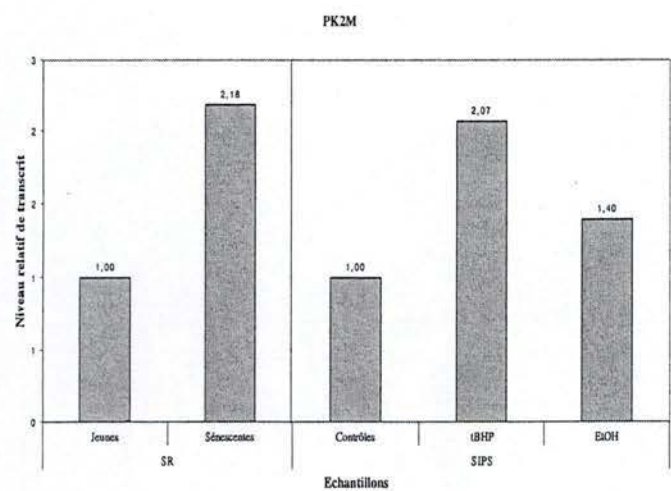
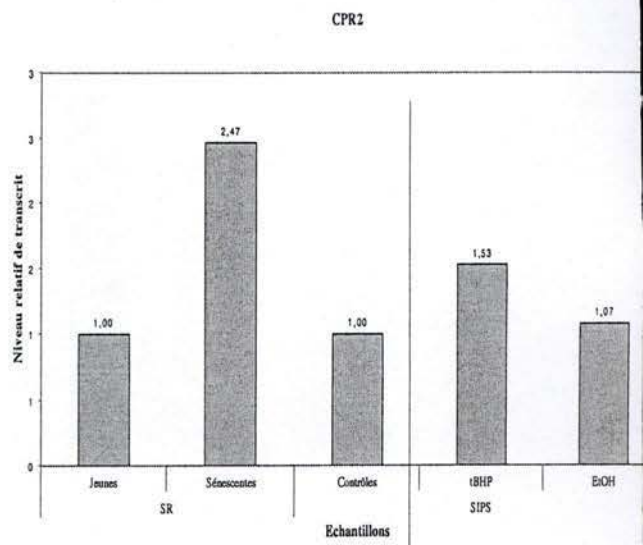
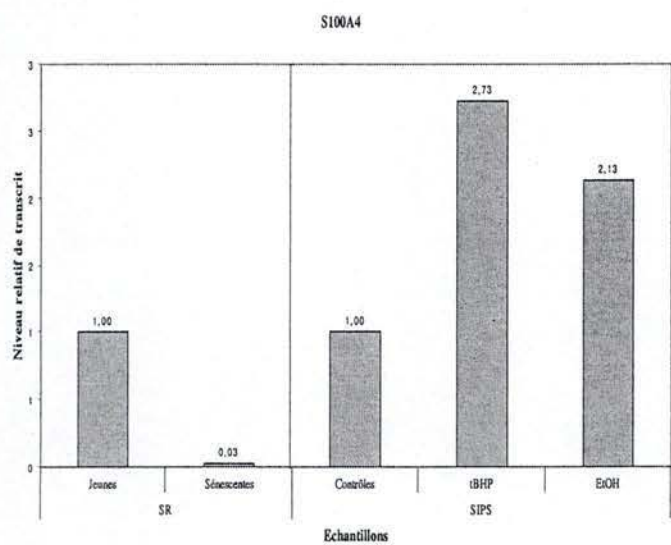
a)



b)

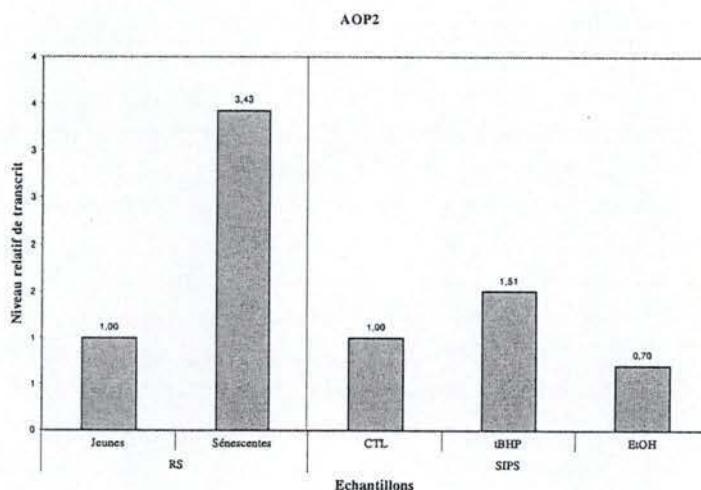


**Figure III.8:** Graphique montrant le niveau relatif de transcrits dans les différentes conditions testées.  
a) Transcrit pour lequel une augmentation de plus de 10 fois est observée dans au moins une condition expérimentale.  
b) Transcrits pour lesquels une augmentation de 5 à 10 fois est observée dans au moins une condition expérimentale.

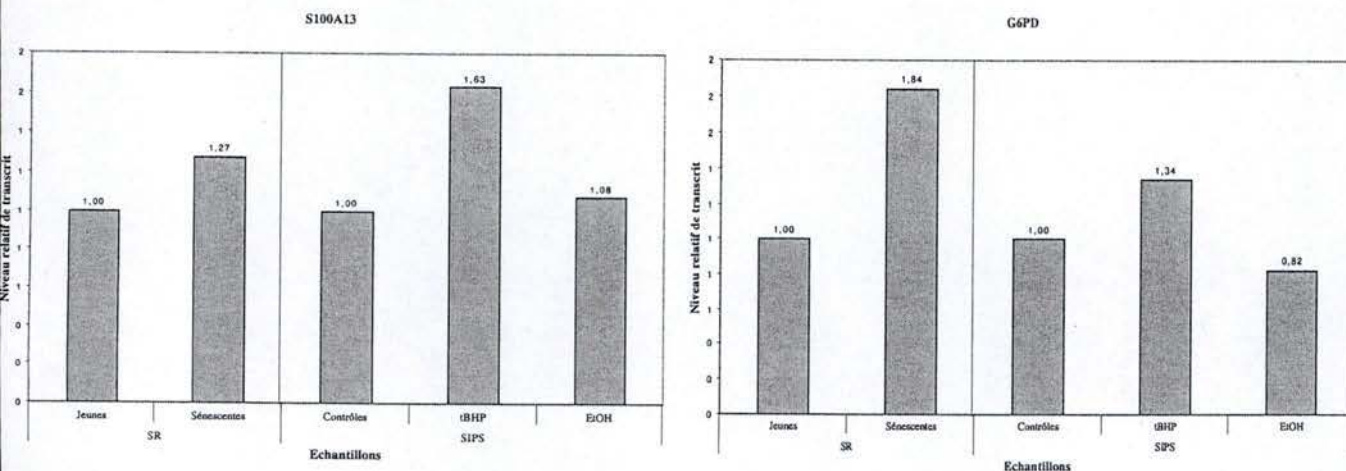


**Figure III.8 c)** Graphique montrant le niveau relatif de transcrits dans les différentes conditions expérimentales. Il s'agit ici de transcrits présentant une augmentation du niveau relatif de 5 à 10 fois dans au moins une condition expérimentale (suite).





**Figure III.8 c)** Graphique montrant le niveau relatif de transcrits dans les différentes conditions expérimentales. Il s'agit ici de transcrits présentant une augmentation du niveau relatif de 5 à 10 fois dans au moins une condition expérimentale.



**Figure III.8 d)** Graphique montrant le niveau relatif de transcrits dans les différentes conditions expérimentales. Il s'agit ici de transcrits présentant une augmentation du niveau relatif inférieure à 2 fois dans au moins une condition expérimentale (suite).

La **figure III.8** montre les résultats obtenus pour les 12 gènes auxquels nous nous intéressons, et ce, à partir des cellules stressées ou sénescentes. Nous pouvons faire plusieurs observations :

### Résultats

*a) Transcrits pour lesquels une augmentation de niveau relatif d'au moins 10 fois est observée dans au moins une condition expérimentale (figure III.8a)*

Le résultat le plus marquant est observé pour l'apolipoprotéine L, où une augmentation du niveau relatif de transcrit de plus de 13 fois est observé dans les cellules sénescentes par rapport aux cellules jeunes "J0". Le résultat obtenu pour les cellules en SIPS est moins éloquent. Une faible augmentation de 1,72 fois est observée suite au traitement au t-BHP. Une faible diminution d'environ 30% est observée en SIPS induite par l'éthanol.

*b) Transcrits pour lesquels une augmentation de niveau relatif de 5 à 10 fois est observée dans au moins une condition expérimentale (figure III.8b)*

Le niveau relatif de transcrit de M83 est augmenté de plus de 7 fois en sénescence répllicative alors qu'une faible augmentation de 1,21 et 1,43 fois est observée en SIPS induite par le t-BHP et l'éthanol respectivement. Dans le cas d'HSP27, on note une augmentation de 5 fois en sénescence répllicative, plus de 3 fois en SIPS induite par le t-BHP et proche de 2 fois en SIPS induite par l'éthanol.

*c) Transcrits pour lesquels une augmentation de niveau relatif de 2 à 5 fois est observée dans au moins une condition expérimentale (figure III.8c)*

Le niveau relatif de transcrit de S100A4 chute fortement en sénescence répllicative alors qu'une augmentation de 2,73 et 2,13 fois est observée en SIPS induite respectivement par le t-BHP. Pour CPR2, une augmentation de 2,47 fois est observée en sénescence répllicative et une augmentation, plus faible, de 1,53 est observée en SIPS induite par le t-BHP. Le niveau de la pyruvate kinase est plus élevé en sénescence répllicative (2,18 fois) et dans les deux types de SIPS (2,07 fois pour le t-BHP et 1,40 fois pour l'éthanol). Pour AOP2, on observe une augmentation de 3,43 fois chez les cellules sénescentes, une augmentation de 1,51 pour les cellules en SIPS induite par le t-BHP et une diminution dans les cellules en SIPS induite par l'éthanol. Des résultats similaires sont obtenus pour ARPC2 avec des valeurs respectives de niveau relatif de transcrit de 1,74 ; 2,40 et 1,77 fois.



*d) Transcrits pour lesquels une augmentation de niveau relatif inférieure à 2 fois est observée dans au moins une condition expérimentale (figure III.8d)*

Le niveau relatif de transcrit de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est augmenté de 1,84 fois chez les cellules sénescents et de 1,34 fois chez les cellules en SIPS induite par le t-BHP. De faibles augmentations du niveau d'expression ont aussi été obtenues pour S100A13, surtout chez les cellules sénescents et les cellules en SIPS induite par l'éthanol.

Au vu des résultats obtenus, au moins deux directions principales peuvent être prises. Une première consiste à déterminer si les modifications de niveau de transcrits s'accompagne ou non de modifications de niveau protéique. La seconde consiste à voir l'effet d'une surexpression de l'ADNc d'un des gènes d'intérêt sur le phénotype et plus précisément, dans le cas qui nous occupe, un effet sur la résistance aux stress (meilleure survie, résistance à la SIPS, etc.). Il existe d'autres voies comme par exemple diminuer le niveau de protéines codée par un gène particulier (utilisation d'oligonucléotides antisens, etc.)

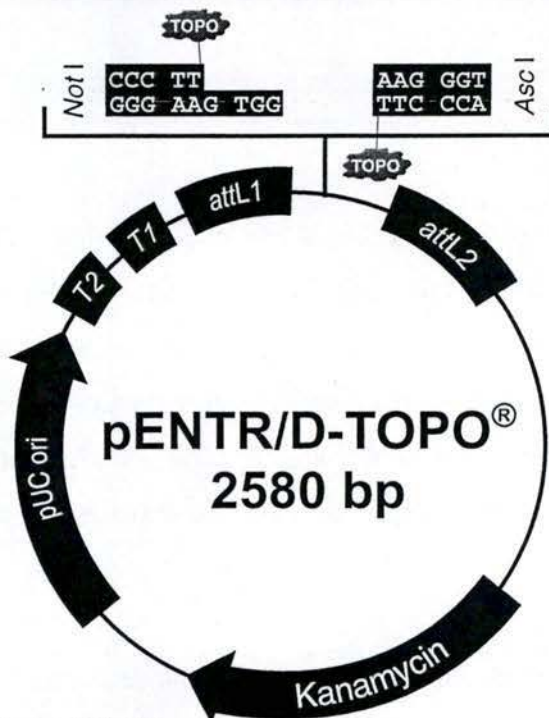
Dans le cadre du temps imparti pour ce mémoire, nous étions contraints de nous limiter aux deux premiers types d'approche et ce, pour un nombre limité de candidats. Vu le rôle évident de HSP27 et AOP2 dans la réponse aux stress et du rôle évident de la PK2M dans le métabolisme énergétique, lui même intervenant dans la réponse aux stress, nous nous sommes limités à ces trois candidats.

### **III.3 Vecteurs d'expression pour la pyruvate kinase, HSP27 et AOP2**

Les constructions relatives à la pyruvate (PK2M) ont été réalisées grâce au système de clonage Gateway dont le principe est décrit dans la partie Matériel et Méthodes.

En ce qui concerne les gènes HSP27 dans le vecteur pCI Néo et AOP2 dans le vecteur PCR3.1, ils nous ont été fournis respectivement par le centre de Génétique moléculaire et cellulaire, CNRS UMR 5534, Lyon et par l'université de Pennsylvanie (Pr. Fisher).

a)



Comments for pENTR/D-TOPO®  
2580 nucleotides

*rrmB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295  
*rrmB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470  
M13 forward (-20) priming site: bases 537-552  
attL1: bases 569-668 (complementary strand)  
TOPO® recognition site 1: bases 680-684  
Overhang: bases 685-688  
TOPO® recognition site 2: bases 689-693  
attL2: bases 705-804  
M13 reverse priming site: bases 845-861  
Kanamycin resistance gene: bases 974-1783  
pUC origin: bases 1904-2577

b)

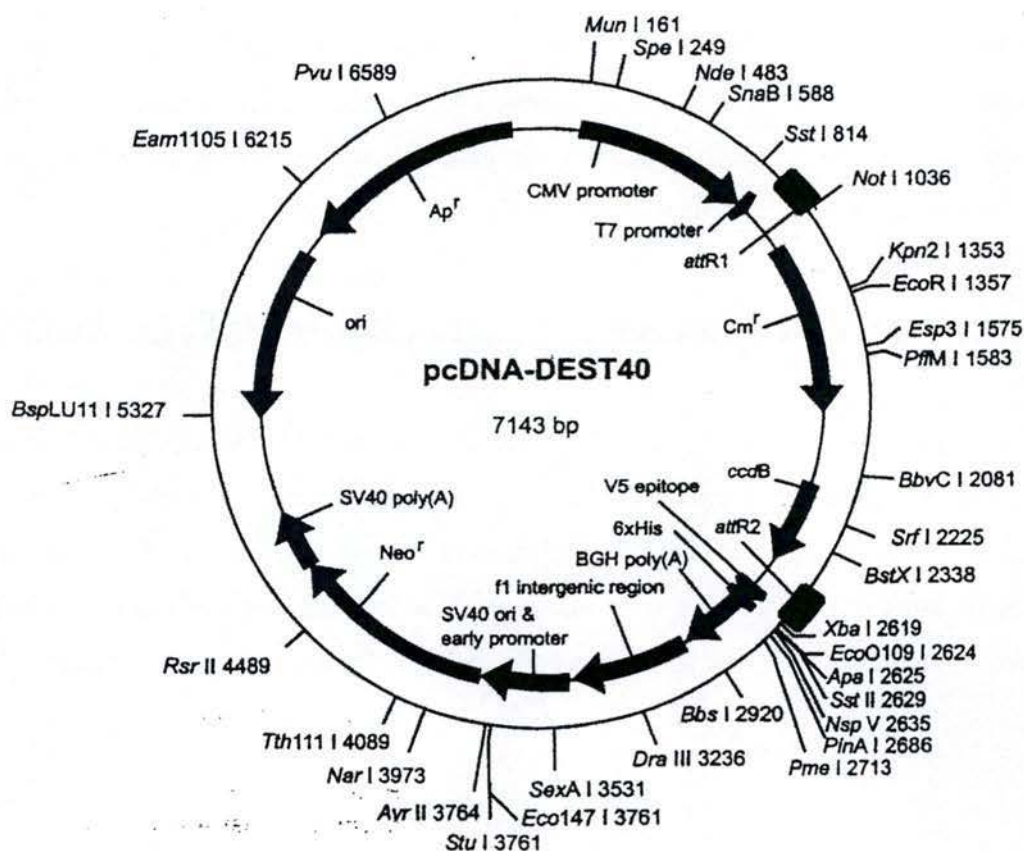


Figure III. 9: a) Schéma représentant le vecteur d'entrée utilisé  
b) Schéma représentant le vecteur de destination utilisé



### III.3.1 Constructions des vecteurs d'entrée pour la pyruvate kinase

L'ADNc correspondant aux gènes de la pyruvate kinase a été commandé chez RZPD (clone IRALp962I1123). Celui-ci a servi de matrice pour la synthèse par PCR d'un fragment correspondant à l'ADNc de la pyruvate kinase, qui a été ensuite inséré dans le vecteur pENTR/D-TOPO (**figure III.9a**) par la technologie du TOPO cloning directionnel (voir Matériel et Méthodes). La présence ou non d'un codon stop à la fin de la phase de lecture permettra l'expression de la pyruvate kinase native (PK2M) ou fusionnée aux épitopes V5 et 6 His à l'extrémité C-terminale de la protéine (PK2MT).

Nous avons par la suite identifié les clones positifs ayant intégré les inserts PK2M et PK2MT par restriction avec les enzymes Bgl II et Not I. Nous observons pour la plupart des candidats les profils de restriction attendus, à savoir une première bande à 540 pb et une seconde à environ 4000 pb (**figure III.10**).

Sur cette base, nous avons sélectionné pour chacune des 2 constructions (pENTR-PK2M1 et pENTR-PK2MT2).

La nature de l'insert a été confirmé par séquençage des extrémités à l'aide des amorces M13 sens et M13 antisens.

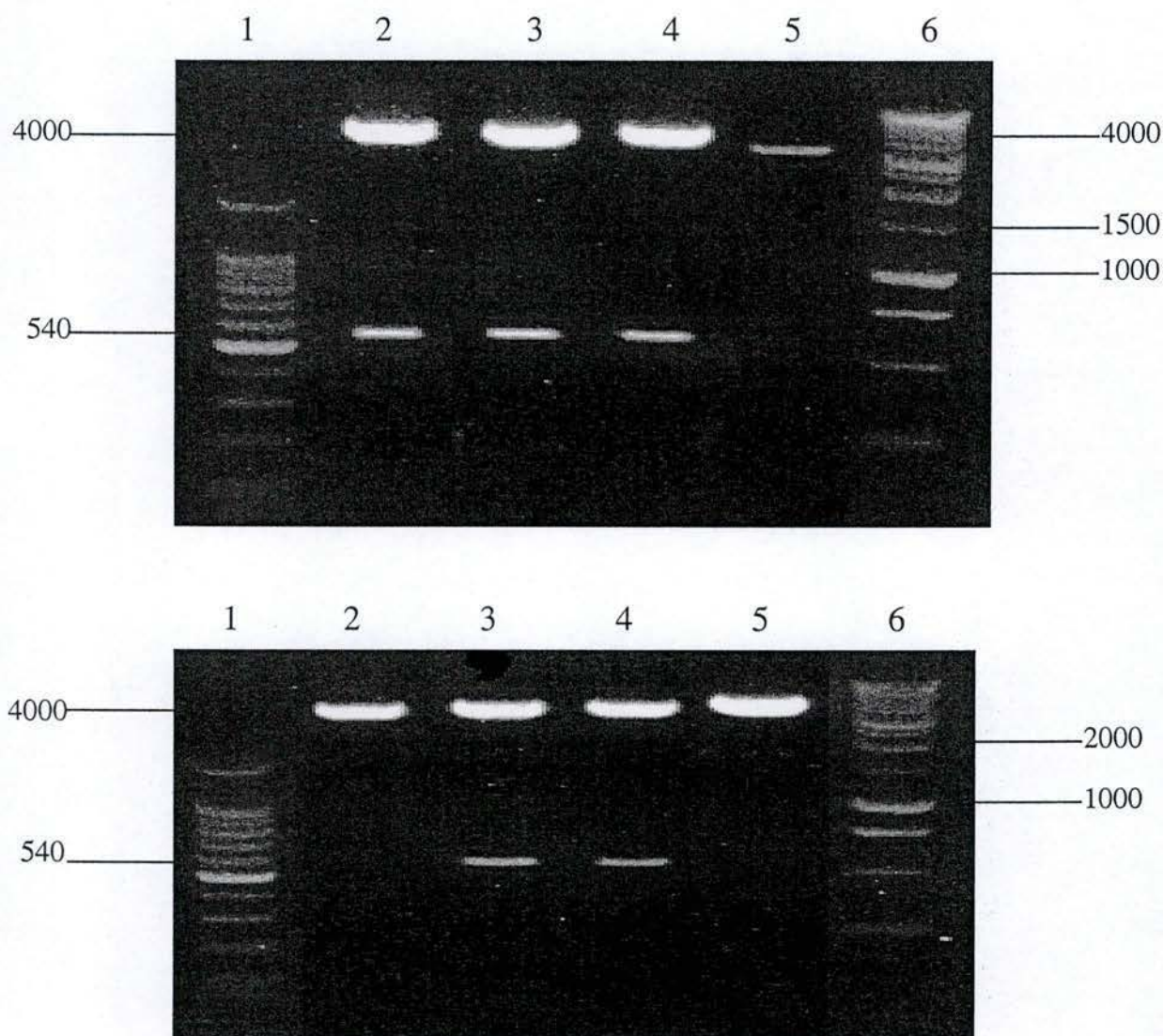
### III.3.2 Constructions des vecteurs de destination (réaction LR)

Des réactions de recombinaisons in vitro ont été réalisées entre les deux clones d'entrée et le vecteur de destination pCDNA DEST-40 (**figure III.9b**).

Après transformation, les clones d'expressions positifs ont été identifiés par analyse de profils de restriction.

Les restrictions à l'aide des enzymes SacI et Hind3 nous ont permis d'identifier les clones positifs, ceux-ci présentent le profil de restriction attendu, c'est-à-dire deux fragments de 300 pb et 7 Kb (**figure III.11**).

Les clones 5 et 22 ont été sélectionnés pour l'expression de la pyruvate kinase native ou fusionnée respectivement. L'identité des inserts a également été vérifiée par séquençage.



1 : Etalon de poids moléculaire (100bp, Promega)

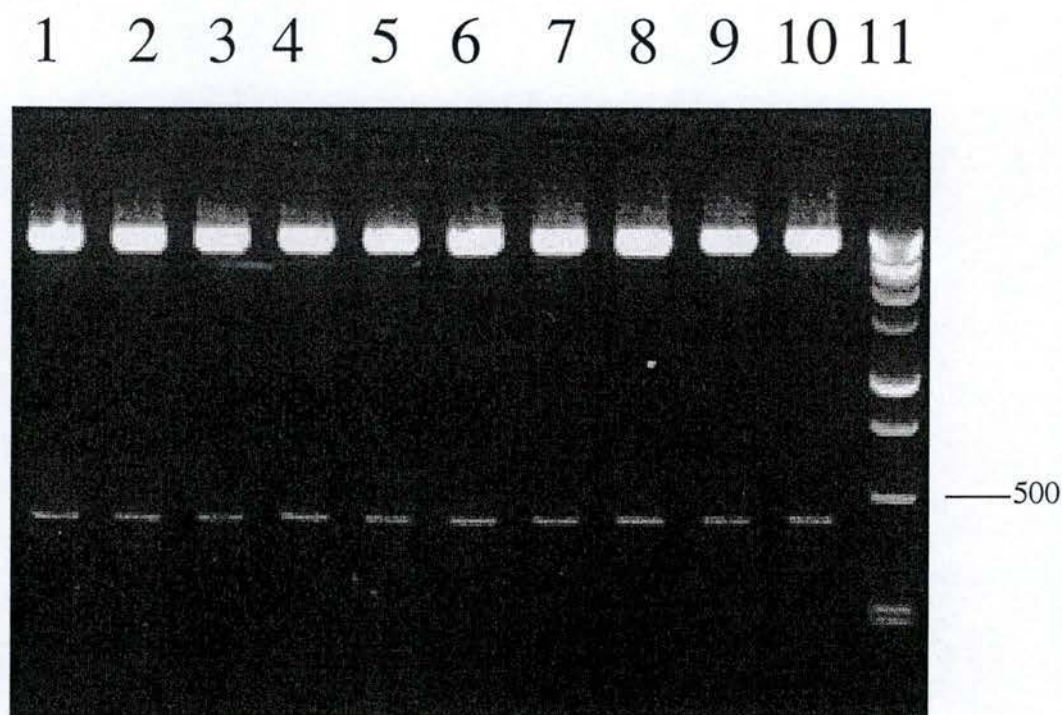
2 à 5 : Profils de restriction de 4 clones de PK2M (a) et PK2MT (b)

6 : Etalon de poids moléculaire (1kb, Promega)

**Figure III.10: a)** Profils de restriction de la PK2M par Bgl II et Not I. 3 clones sur 4 (piste 1 à 3) présentent le bon profil, c'est-à-dire une bande à 540 pb représentant l'insert, et une autre à 4000 pb représentant le vecteur.

**b)** Profils de restriction de la PK2MT par Bgl II et Not I. 2 clones sur 4 (piste 3 et 4) présentent le profil correct.





Gel d'agarose 2%

- 1: PK2M [5] restreint par Sac I et Hind III
- 2: PK2M [7] restreint par Sac I et Hind III
- 3: PK2M [30] restreint par Sac I et Hind III
- 4: PK2M [39] restreint par Sac I et Hind III
- 5: PK2M [45] restreint par Sac I et Hind III
- 6: PK2MT [18] restreint par Sac I et Hind III
- 7: PK2MT [21] restreint par Sac I et Hind III
- 8: PK2MT [22] restreint par Sac I et Hind III
- 9: PK2MT [37] restreint par Sac I et Hind III
- 10: PK2MT [47] restreint par Sac I et Hind III
- 11: 1 kb DNA ladder (Promega)

**Figure III.11:** Profils de restriction des différentes constructions dans pDEST40. Les numéros entre crochets indiquent les numéros de clones positifs pour les différentes constructions.

### **III.4 Transfection des fibroblastes WI-38 immortalisés et courbes de survie au *t*-BHP**

Les cellules SV40 ont été transfectées par la méthode au phosphate de calcium avec les vecteurs d'expression contenant nos gènes d'intérêt à savoir les vecteurs pDEST40-PK2MT22, pDEST40-PK2M5, pCI Neo-HSP27, PCR 3.1-AOP2 ainsi qu'avec les trois vecteurs vides (**figure III.12**). Ensuite, les cellules transfectées ont été sélectionnées en présence de néomycine (400 µg / ml) durant 10 jours.

Nous avons remarqué que les cellules transfectées avec la PK, fusionnée ou non, semblaient se diviser plus rapidement que les autres transfectants. Nous supposons un effet mitogène de la pyruvate kinase sur ces cellules. Cette hypothèse devra être vérifiée ultérieurement par mesure d'incorporation de thymidine tritiée.

#### **III.4.1 Estimation de la survie cellulaire après stress**

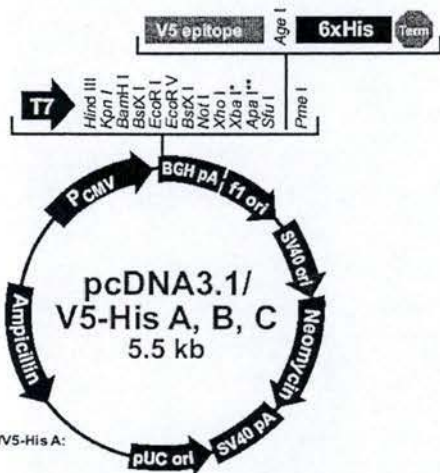
A partir des cellules transfectées, et sélectionnées à la néomycine, nous avons étudié l'effet de la surexpression de la pyruvate kinase et d'HSP27 sur la résistance des cellules à des doses croissantes de *t*-BHP (0-1500 µM) pendant 2 h. Pour chaque concentration et pour les différentes constructions, des triplicats ont été réalisés. 24 heures après le traitement, nous avons dosé la quantité de protéines présentes dans les puits, ce qui permet d'estimer le nombre de cellules résistant aux différentes doses de *t*-BHP et de dresser les courbes de survie illustrées à la **figure III.13** (Dumont *et al.*, 2000).

#### **Résultats :**

Après les stress au *t*-BHP, on note surtout que la quantité de protéines chute brutalement dès 125 µM sous *t*-BHP. Des effets protecteurs sembleraient se dégager si ce n'est que la courbe de survie obtenue pour les cellules transfectées avec pCDNA 3.1 vide est farfelue, puisque les valeurs augmentent en fonction de la concentration en *t*-BHP.

Il faudra recommencer cette expérience et tester des concentrations intermédiaires comprises entre 0 et 125 µM.



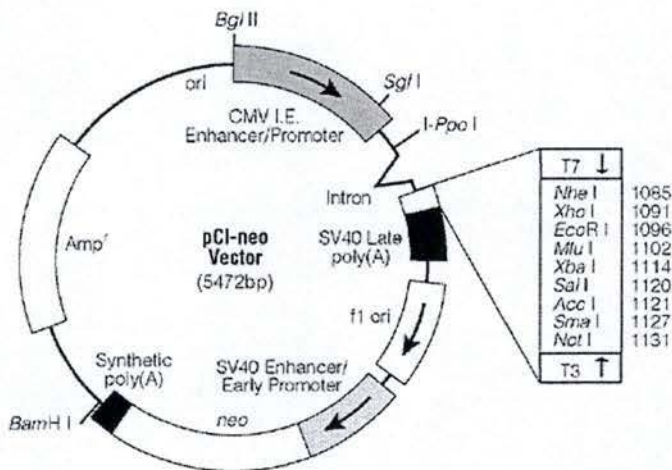


Comments for pcDNA3.1/V5-His A:  
5502 nucleotides

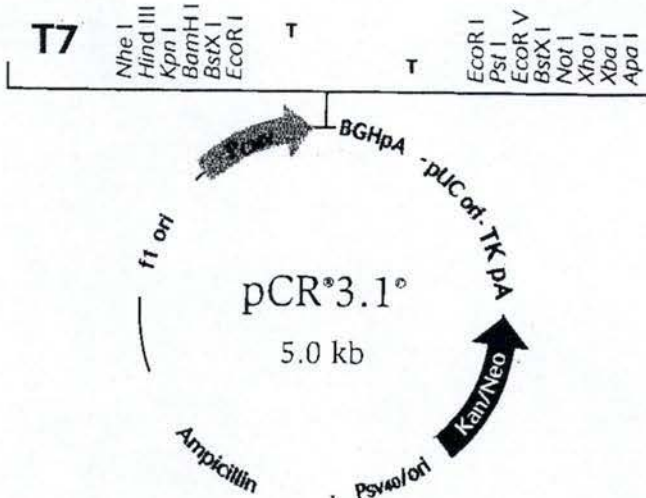
CMV promoter: bases 209-863  
T7 promoter/priming site: bases 863-882  
Multiple cloning site: bases 902-999  
V5 epitope: bases 1000-1041  
Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1051-1068  
BGH reverse priming site: bases 1091-1108  
BGH polyadenylation signal: bases 1090-1304  
f1 origin of replication: bases 1357-1780  
SV40 promoter and origin: bases 1845-2169  
Neomycin resistance gene: bases 2205-2999  
SV40 polyadenylation signal: bases 3018-3256  
pUC origin: bases 3688-4361 (C)  
Ampicillin resistance gene: bases 4506-5366 (C)  
(C) = complementary strand

\* After the Xho I site, there is a unique  
BstE II site, but no Xba I or Apa I  
sites in version C.

\*\* There is a unique Sac II site  
between the Apa I site and the Sfi  
I site in version B only.

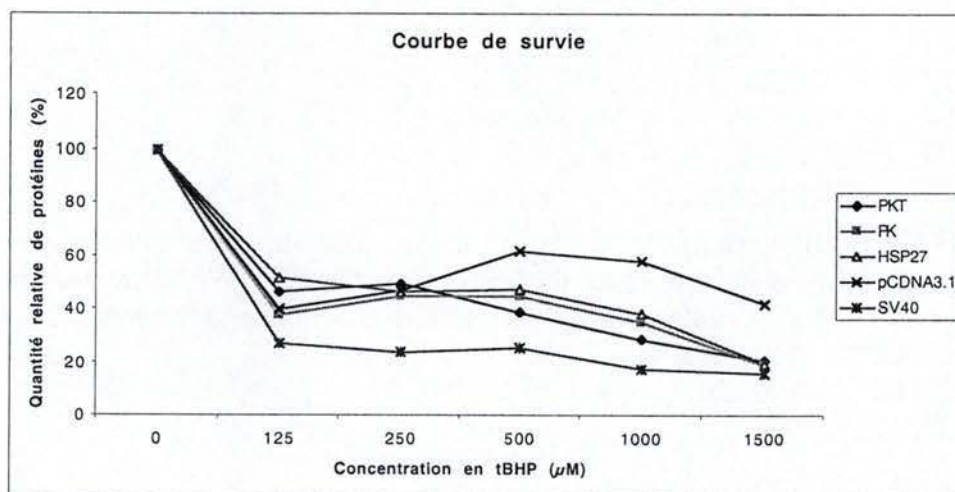


591464w4.31



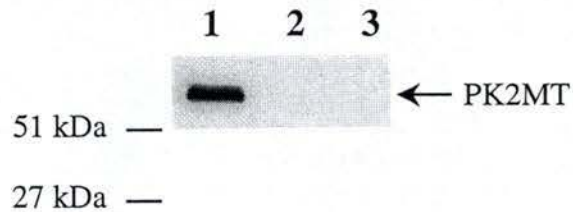
See polylinker sequences on the web.

Figure III.12 : Schéma représentant les trois vecteurs d'expression utilisés pour les transfections

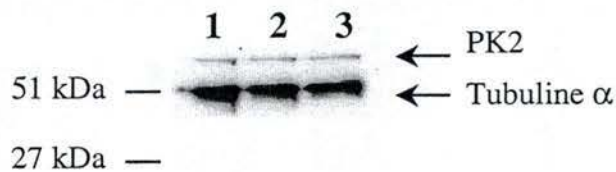


**Figure III.13:** Courbe de survie des fibroblastes SV40 24 h après des stress au *t*-BHP à différentes concentrations.





**Figure III.14 a)** Western blot réalisé au moyen d'un anticorps anti-épitope V5 sur des extraits protéiques provenant de fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40 (SV40) transfectés et sélectionnés à la néomycine.  
 Puits 1: pDEST40-PK2MT  
 Puits 2: pDEST40-PK2M  
 Puits 3: pCDNA



**Figure III.14 b)** Western blot réalisé au moyen des anticorps spécifiques anti-PK2M et anti-tubuline  $\alpha$  (contrôle de charge) sur des extraits protéiques provenant de fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40 (SV40) transfectés et sélectionnés à la néomycine.  
 Puits 1: pDEST40-PK2MT  
 Puits 2: pDEST40-PK2M  
 Puits 3: pCDNA

### **III.5 Vérification de la surexpression des protéines par western blot**

Nous avons choisi la technique du western blot afin de vérifier la surexpression de la pyruvate kinase (PK2M et PK2MT), d'HSP27 et d'AOP2 chez les cellules transfectées avec les vecteurs PK2M-pDEST40, PK2MT-pDEST40, HSP27-pCI Néo et AOP2-PCR 3.1. La quantité de protéines recombinantes a été comparée aux extraits de cellules transfectées par les vecteurs vides.

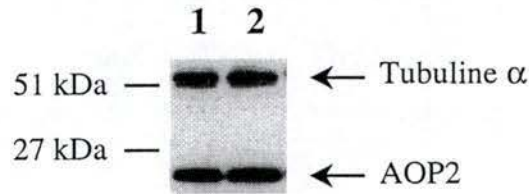
Nous avons réalisé deux western blot pour la pyruvate kinase. Le premier nous a permis, grâce à l'anticorps anti-V5, de détecter la forme fusionnée de la PK2M au poids moléculaire attendu (58 kDa, piste 3). Comme nous nous y attendions, l'anticorps anti-V5 ne reconnaît pas la forme non taggée de la PK2M (**figure III.14a**).

Un second western blot a été réalisé en utilisant l'anticorps anti-PK2M. Nous constatons une bande à la hauteur de la PK2M (58 kDa) dans les trois puits (**figure III.14b**). Il nous est cependant difficile de mettre en évidence la protéine recombinante par rapport à la pyruvate kinase endogène.

De la même manière, aucune surexpression n'a pu être démontrée pour les protéines HSP27 et AOP2 (**figure III.15 a et b**) avec leurs anticorps spécifiques.

Ces résultats doivent cependant être interprétés avec précaution. Il faut en effet souligner que si la surexpression est évidente à l'aide de l'anticorps anti-V5, celle-ci est difficile à démontrer au moyen de l'anticorps anti-PK2M spécifique de la pyruvate kinase. Il est également important de souligner que ces expériences ont été réalisées sur une population hétérogène de cellules sélectionnées à la néomycine, et non pas sur une population clonale testée et sélectionnée pour une expression optimale.

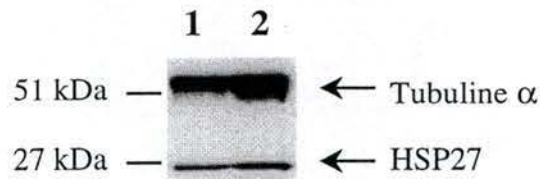




**Figure III.15 a)** Western blot réalisé au moyen des anticorps spécifiques anti-AOP2 et anti-tubuline  $\alpha$  (contrôle de charge) sur des extraits protéiques provenant de fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40 (SV40) transfectés et sélectionnés à la néomycine.

Puits 1: PCR 3.1-AOP2

Puits 2: PCR 3.1



**Figure III.15 a)** Western blot réalisé au moyen des anticorps spécifiques anti-HSP27 et anti-tubuline  $\alpha$  (contrôle de charge) sur des extraits protéiques provenant de fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40 (SV40) transfectés et sélectionnés à la néomycine.

Puits 1: pCI Neo-HSP27

Puits 2: pCI Neo

**Conclusions  
et  
Perspectives**



## **IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Dans ce travail, nous avons tout d'abord étudié le niveau relatif de 12 transcrits chez des fibroblastes WI-38 en Sénescence Induite Prématurément par des Stress (SIPS) par le *t*-BHP ou par l'EtOH, ou en Sénescence Réplicative (SR). Nous avons utilisé la technique de RT-PCR en temps réel afin de valider les résultats obtenus par approche transcriptomique (Differential Display RT-PCR) et par approche protéomique (gels 2D).

*En ce qui concerne les transcrits identifiés suite au DD RT-PCR, peu de renseignements sont connus:*

**KPNB1 ou karyophérine  $\beta$ -1** joue un rôle dans le transport des protéines cytoplasmiques possédant une séquence consensus NLS vers le noyau (Pemberton *et al.*, 1998). On pourrait donc s'attendre à ce que ces protéines, une fois dans le noyau, jouent le rôle de régulateur d'expression d'autres gènes intervenant dans la sénescence ou la SIPS.

**RPN2 ou ribophorine 2** ainsi que la ribophorine 1 semblent être impliquées dans la liaison du ribosome à l'ARNm (Crimaudo *et al.*, 1987).

**M83** est une protéine à 5 domaines transmembranaires de 84 kDa exprimée en surface cellulaire dont on ne connaît rien de la fonction (Motohashi *et al.*, 2000).

**ARPC2** (p34-Arc) code pour une protéine intervenant comme sous-unité du complexe Arp 2/3. Ce complexe intervient dans l'augmentation de la polymérisation des monomères d'actine et dans l'organisation des filaments d'actine en structure tridimensionnelle (Mullins *et al.*, 1998). Ce complexe pourrait peut-être jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette lors du changement de la morphologie cellulaire observé en SIPS et en SR, plus particulièrement dans la formation de fibres de stress (Chen *et al.*, 2000b).

**S100A4 et S100A13** sont des protéines de liaison au calcium à motifs "two EF-hand". Une des fonctions de S100A4 est de moduler la dynamique du cytosquelette (pour une revue: (Donato, 2001)).

**CPR2** (cell cycle progression 2 protein) est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, plus particulièrement dans l'arrêt en phase G1, observée chez les cellules sénescents et chez les cellules en SIPS (Edwards *et al.*, 1997).

**ApoL** (apolipoprotéine L1): Il existe 6 membres dans la famille des apolipoprotéines. L'apolipoprotéine L1 est ubiquiste. Une altération de son expression lors de la grossesse



entraîne un retard de croissance du fœtus (Page *et al.*, 2001). Un rapport direct avec la sénescence cellulaire n'est pas évident, ceci justifiant peut-être son étude plus approfondie pour mettre à jour des fonctions plus précises de cette protéine.

Notons aussi qu'il y a peu de concordance entre les niveaux différentiels de transcrits suggérés par les résultats du DD RT-PCR et ceux obtenus après vérification de ces différences par RT-PCR en temps réel. Ceci conforte donc la nécessité absolue de vérifier les résultats obtenus par DD RT-PCR au moyen d'une technique alternative.

En ce qui concerne les quatre candidats identifiés par l'étude protéomique, une surexpression de la pyruvate kinase, est observée dans les cellules en SIPS et dans les cellules sénescents, et ce, tant au niveau protéique sur gel 2D qu'au niveau des transcrits étudiés par RT-PCR en temps réel. La pyruvate kinase est l'enzyme régulatrice clé de la glycolyse transformant le phosphoénolpyruvate en pyruvate. D'autres études ont montré qu'il y avait une corrélation entre l'augmentation du contenu en pyruvate kinase, une augmentation de l'activité glycolytique chez les cellules sénescents, ainsi qu'une production plus élevée de lactate (Goldstein *et al.*, 1982).

En ce qui concerne l'AOP2 ou 1 cys-péroxyredoxine, une surexpression est observée dans les cellules en SIPS induite par le *t*-BHP aussi bien au niveau du transcrit qu'au niveau de la protéine. Il faut remarquer qu'il existe plusieurs isoformes de la protéine, représentées par des spots différents sur gel 2D et que ces différentes isoformes ne sont pas exprimées de la même manière dans les cellules sénescents. L'AOP2 possède deux activités: une activité phospholipase A<sub>2</sub> et une activité glutathion peroxydase (Chen *et al.*, 2000a). Elle permet donc de détoxifier les phospholipides peroxydés générés par les stress oxydatifs. Contrairement aux résultats observés au niveau protéique, une baisse du niveau des transcrits de l'AOP2 est observée chez les cellules en SIPS induite par l'éthanol.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est sous-exprimée chez les cellules sénescents. Un phénotype sénescents est caractérisé par un potentiel prolifératif réduit et l'apparition de l'activité S.A  $\beta$ -gal (Ho *et al.*, 2000). La G6PD est la première enzyme de la voie des pentoses phosphates, principale source de NADPH et de ribose-5-phosphate, intervenant dans la synthèse des bases de l'ADN (Kletzien *et al.*, 1994). Une diminution de la quantité en G6PD favorise l'utilisation du glucose comme substrat de la glycolyse. Ceci doit être ajouté à l'augmentation de la PKM qui favorise, elle aussi, la glycolyse. Cette augmentation de la voie glycolytique pourrait contrecarrer la diminution de l'activité



a)

RT-PCR en temps réel	Sén.	<i>t</i> -BHP	EtOH
HSP27	533	315	199
G6PD	184	134	82
PK2M	218	207	140
AOP2	343	151	70

b)

Gels 2D	Sén.	<i>t</i> -BHP	EtOH
HSP27	130		
G6PD	65		
PK2M (1) (2)	147	174	136 150
AOP2 (1) (2)	48 178	144	156 151

**Figure IV.1:** Tableau comparant les résultats du niveau d'expression différentiel de quatre gènes obtenus par gels 2D (approche protéomique) et par RT-PCR en temps réel (approche transcriptomique). Les chiffres entre parenthèses représentent les différentes isoformes de la protéine et qui ont été détectés sur le gel.

mitochondriale quant à la production d'ATP. Une baisse d'activité de la G6PD favorise aussi l'arrêt du cycle cellulaire via une diminution de la quantité de bases constituant l'ADN.

La petite protéine chaperone HSP27 (small Heat Shock Protein) présente une surexpression aussi bien au niveau de son transcrit qu'au niveau de la protéine. D'autres études ont montré qu'elle pouvait protéger les cellules contre des stress oxydatifs en favorisant la présentation des protéines oxydées au protéasome, permettant ainsi leur dégradation (Arrigo, 2001). Ce rôle protecteur pourrait donc être accru suite à l'augmentation de son niveau d'ARN et de protéine.

L'étude protéomique visant à comparer les cellules en SIPS et en SR a montré que plusieurs isoformes de la même protéine peuvent présenter une différence de niveaux dans les différentes conditions expérimentales étudiées. Cela ne veut pas dire que les protéines pour lesquelles on a mis en évidence un changement de niveau protéique d'une seule isoforme ne sont pas présentes ailleurs, à un niveau inchangé sur le gel 2D, sous d'autres isoformes. Donc, cela rend difficile la comparaison entre des variations de niveau protéique trouvées pour une isoforme sur un gel 2D et les résultats issus de la détermination du niveau total de transcrits.

Cependant, pour la plupart des protéines connaissant une augmentation de niveau d'expression en SIPS ou chez les cellules sénescents, on trouve une augmentation de niveau de transcrits (figure IV.1).

L'ADNc de ces candidats (HSP27, AOP2 et PK2M) a été cloné dans des vecteurs d'expression Afin d'étudier le rôle que pourrait avoir la surexpression de chacune de ces protéines dans la résistance de fibroblastes SV40 à des stress cytotoxiques, nous avons réalisé des transfections au phosphate de calcium de ces 3 constructions dans des fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40. Les expériences ont dû être réalisées avec des cellules non encore au bout de leur processus de sélection. Ces expériences préliminaires devront être recommencées lorsque le processus de sélection sera terminé.

Pour les gènes dont la fonction est inconnue, des expériences de transfection en vue de leur surexpression pourraient être utiles. Cela permettrait d'avoir une indication sur le rôle qu'ils pourraient avoir dans le cycle cellulaire, l'apoptose ou bien encore dans la réponse aux stress cytotoxiques et subcytotoxiques.

Une étude sur la durée de vie de la levure a été réalisée à l'Université de Gand (Chen *et al.*, soumis). Cette équipe a développé une stratégie permettant de cloner une librairie d'ADNc humain dans un modèle de levure, à raison d'un ADNc par levure. La méthode est basée sur l'analyse de cellules de levure montrant un nombre plus élevé de divisions cellulaires indiqué par un nombre plus élevé de cicatrices sur la surface des cellules mères. Ces cicatrices sont



prises en évidence par un fluorochrome et permettent de sélectionner les gènes augmentant la durée de vie proliférative. Ils ont en effet montré, pour un gène de fonction précédemment inconnue, que ce gène prolongeait la durée de vie proliférative de *C. elegans*. Ils se posent actuellement la question de savoir si la résistance accrue à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observée dans la levure exprimant ce gène, se retrouvera aussi chez des cellules humaines confrontées à des stress oxydatifs cytotoxiques et subcytotoxiques. On sait en effet qu'il existe une corrélation entre la résistance cellulaire à divers stress et la durée de vie de l'espèce dont les cellules sont prélevées (Kirkwood *et al.*, 2000). Divers mutants de *C. elegans* possèdent une durée de vie accrue et une résistance accrue aux stress de différentes natures (Murakami *et al.*, 2000).

Dans ce mémoire, nous avons montré que les différentes étapes de clonage et de transfection dans des cellules humaines que nous avons réalisées pour trois gènes (HSP27, AOP2 et PK2M), afin d'étudier leur rôle dans la résistance contre des stress cytotoxiques, constituent un moyen idéal de tester l'hypothèse d'un rôle de protection contre les stress.

L'étape suivante serait de réaliser des transfections stables de nos candidats par la méthode des rétrovirus pour pouvoir étudier leur rôle dans la SIPS et l'apparition des biomarqueurs de la sénescence répliquative ainsi que leurs effets sur le nombre de doublements cumulatifs de population.

Après cela, il serait envisageable de générer des souris knock-out ou transgéniques pour un nombre limité de ces gènes afin de voir s'ils sont essentiels à la survie cellulaire, ou s'ils modulent la durée de vie de ces animaux ou s'ils modulent des fonctions physiologiques particulières.

# **Bibliographie**



## **V BIBLIOGRAPHIE**

- Allsopp R. C., H. Vaziri *et al.*, *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10114-10118, 1992.
- Arrigo A. P., *Hsp27: novel regulator of intracellular redox state*, IUBMB Life, 52, 303-7, 2001.
- Atadja P. W., K. F. Stringer *et al.*, *Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging*, Mol Cell Biol, 14, 4991-9., 1994.
- Bayreuther K., H. P. Rodemann *et al.*, *Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage*, Proc Natl Acad Sci U S A, 85, 5112-6, 1988.
- Bodnar A. G., M. Ouellette *et al.*, *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*, Science, 279, 349-52, 1998.
- Bustin S. A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*, J Mol Endocrinol, 25, 169-93, 2000.
- Campisi J., *Replicative senescence and immortalization*, in "The molecular basis of cell cycle and growth control", G. S. Stein (Eds), 348-373, 1999.
- Chainiaux F., J. P. Magalhaes *et al.*, *UVB-induced premature senescence of human diploid fibroblasts*, The international Journal of Biochemistry & cell biology, soumis.
- Chen C., S. Dewaele *et al.*, *A high-throughput screening system for genes extending life-span*, Nature Biotechnology, soumis.
- Chen J. W., C. Dodia *et al.*, *1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities*, J Biol Chem, 275, 28421-7., 2000a.
- Chen Q. M., V. C. Tu *et al.*, *Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide*, J Cell Sci, 113, 4087-97., 2000b.
- Crimando C., M. Hortsch *et al.*, *Human ribophorins I and II: the primary structure and membrane topology of two highly conserved rough endoplasmic reticulum-specific glycoproteins*, Embo J, 6, 75-82, 1987.
- Dierick J.-F., F. Eliears *et al.*, *Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence*, Biochem Pharmacol, in press.
- Dierick J. F., D. Kalume *et al.*, *Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence-like phenotype after proteomic profiling*, soumis.
- Dimri G. P., X. Lee *et al.*, *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 9363-7., 1995.
- Dimri G. P., M. Nakanishi *et al.*, *Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein*, Mol Cell Biol, 16, 2987-97, 1996.

- Donato R., *S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles*, Int J Biochem Cell Biol, 33, 637-68, 2001.
- Dumont P., M. Burton *et al.*, *Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast*, Free Radic Biol Med, 28, 361-73., 2000.
- Dumont P., V. Royer *et al.*, *Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence*, FEBS Lett, 502, 109-12., 2001.
- Edwards M. C., N. Liegeois *et al.*, *Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far-phenotype on yeast cells*, Genetics, 147, 1063-76., 1997.
- Goldstein S., S. R. Ballantyne *et al.*, *Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro*, J Cell Physiol, 112, 419-24., 1982.
- Good L., G. P. Dimri *et al.*, *Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence*, J Cell Physiol, 168, 580-8, 1996.
- Greider C. W. and E. H. Blackburn, *Telomeres, telomerase and cancer*, Sci Am, 274, 92-7., 1996.
- Hara E., R. Smith *et al.*, *Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence*, Mol Cell Biol, 16, 859-67., 1996.
- Harley C. B., A. B. Futcher *et al.*, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*, Nature, 345, 458-460, 1990.
- Hastie D. N., M. Dempster *et al.*, *Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging*, Nature, 346, 866-868, 1990.
- Hayflick L., *The cellular basis for biological aging.*, in "Handbook of the biology of aging.", C. E. Finch, Hayflick, L. (Eds), Von Nostrand R., 159, 1977.
- Hayflick L. and P. S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strain*, Exp. Cell Res., 25, 585-621, 1961.
- Ho H. Y., M. L. Cheng *et al.*, *Enhanced oxidative stress and accelerated cellular senescence in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient human fibroblasts*, Free Radic Biol Med, 29, 156-69, 2000.
- Kirkwood T. L., P. Kapahi *et al.*, *Evolution, stress, and longevity*, J Anat, 197 Pt 4, 587-90., 2000.
- Kletzien R. F., P. K. Harris *et al.*, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress*, Faseb J, 8, 174-81, 1994.
- Kurz D. J., S. Decary *et al.*, *Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*, J Cell Sci, 113 ( Pt 20), 3613-22, 2000.
- Lee C. M., R. Weindruch *et al.*, *Age-associated alterations of the mitochondrial genome*, Free Radic Biol Med, 22, 1259-69, 1997.



- Lowry O. H., N. J. Rosebrough *et al.*, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
- Mantle D. and V. R. Preedy, *Free radicals as mediators of alcohol toxicity*, Adverse Drug React Toxicol Rev, 18, 235-52., 1999.
- Martin G. M., C. A. Sprague *et al.*, *Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype*, Lab. Invest., 23, 86-92, 1970.
- Meyne J., R. L. Ratliff *et al.*, *Conservation of human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7049-7053, 1989.
- Motohashi T., S. Miyoshi *et al.*, *Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel five-span transmembrane protein gene, M83*, Biochem Biophys Res Commun, 276, 244-50, 2000.
- Mullins R. D., J. A. Heuser *et al.*, *The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 6181-6, 1998.
- Murakami S., P. M. Tedesco *et al.*, *Molecular genetic mechanisms of life span manipulation in Caenorhabditis elegans*, Ann N Y Acad Sci, 908, 40-9., 2000.
- Noda A., Y. Ning *et al.*, *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*, Exp. Cell Res., 211, 90-98, 1994.
- Ochi T. and S. Miyaura, *Cytotoxicity of an organic hydroperoxide and cellular antioxidant defense system against hydroperoxides in cultured mammalian cells*, Toxicology, 55, 69-82, 1989.
- Ozawa T., S. Sugiyama *et al.*, *Mitochondrial DNA mutations and disturbances of energy metabolism in myocardium*, Jpn Circ J, 55, 1158-64., 1991.
- Page N. M., D. J. Butlin *et al.*, *The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution*, Genomics, 74, 71-8, 2001.
- Pardee A. B., *A restriction point for control of normal animal cell proliferation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 71, 1286-90., 1974.
- Pemberton L. F., G. Blobel *et al.*, *Transport routes through the nuclear pore complex*, Curr Opin Cell Biol, 10, 392-9, 1998.
- Remacle J., M. Raes *et al.*, *Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function*, Mut. Res., 316, 103-122, 1995.
- Rodemann H. P., *Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro*, Differentiation, 42, 37-43., 1989.
- Rodemann H. P., K. Bayreuther *et al.*, *Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro*, Exp Cell Res, 180, 84-93., 1989a.
- Rodemann H. P., K. Bayreuther *et al.*, *The differentiation of normal and transformed human fibroblasts in vitro is influenced by electromagnetic fields*, Exp Cell Res, 182, 610-621., 1989b.

- Sanchez-Amate M. C., M. P. Carrasco *et al.*, *Persistence of the effects of ethanol in vitro on the lipid order and enzyme activities of chick-liver membranes*, Eur. J. Pharmacol, 292, 215-221, 1995.
- Serrano M., A. W. Lin *et al.*, *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*, Cell, 88, 593-602., 1997.
- Seshadri T. and J. Campisi, *Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts*, Science, 247, 205-9., 1990.
- Stein G. H., M. Beeson *et al.*, *Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts*, Science, 229, 666-669, 1990.
- Toussaint O., A. Houbion *et al.*, *Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture*, Mech Ageing Dev, 65, 65-83., 1992.
- Toussaint O., C. Michiels *et al.*, *Cellular aging and the importance of energetic factors*, Exp. Gerontol., 30, 1-22, 1995.
- Toussaint O., J. Remacle *et al.*, *Hormesis: a quest for virtuality?*, Hum Exp Toxicol, 20, 311-4; discussion 319-20., 2001.
- Toussaint O., J. Remacle *et al.*, *Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likeliness of in vivo occurrence*, Biogerontology, 3, 13-7, 2002.
- von Zglinicki T., G. Saretzki *et al.*, *Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence ?*, Exp. Cell Res., 220, 186-193, 1995.
- Wilkins M. R., C. Pasquali *et al.*, *From proteins to proteomes : large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis*, Bio-Technology, 14, 61-65, 1996.